

Title	セイヨウアサガオの子葉篩管液による花成制御(博士論文全文)
Author(s)	渡辺, 久修
Citation	
Issue Date	2016-12-06
URL	http://hdl.handle.net/10232/29241

セイヨウアサガオの子葉篩管液による花成制御

渡辺 久修

2016

目次

	ページ
序論	1
1 光周性と花成	2
2 花成誘導物質	4
3 花成阻害物質	7
4 FT タンパク質	9
引用文献	15
第1章 低分子花成誘導物質	28
第1節 摘要	29
第2節 緒言	30
第3節 材料と方法	34
第4節 結果	41
第5節 考察	51
引用文献	54
第2章 低分子花成阻害物質	59
第1節 摘要	60
第2節 緒言	61
第3節 材料と方法	64
第4節 結果	70
第5節 考察	79
引用文献	81

第3章 高分子花成誘導物質	85
第1節 摘要	86
第2節 緒言	87
第3節 材料と方法	89
第4節 結果	95
第5節 考察	107
引用文献	110
総括	114

序論

1 光周性と花成

花成(花芽形成)は栄養成長から生殖成長への転換を意味し、植物の生活環の中でも非常に重要な変化といえる。植物の花芽形成過程は、花成誘導(Floral induction, Flower bud formation)、花成誘起(Floral evocation)、花器官形態形成(Floral morphogenesis)の三段階に分けることができる。この過程は様々な環境要因によって起こり、特に花成誘導は多くの植物において日長条件や低温といった環境要因によって制御されていることが知られている。

植物は花成を引き起こす条件によって分類することができる。日長がある時間より長くなると花成が誘導される長日植物、短くなると花成が誘導される短日植物、花成誘導に低温を必要とする低温要求性植物、花成誘導が環境要因に影響されない中性植物である。

植物が日長に反応する現象はTournois (1911, 1912)によって発見された。彼は、アサ(*Cannabis sativa*)とホップ(*Humulus lupulus*)を用いた研究で、短日条件で育てた植物が自然の光周期下(長日条件)で育てた植物より開花が早く、さらにその花成誘導には明期より暗期の方が重要であることに気付いた。その後、GarnerとAllard (1920)が短日性のタバコ(*Nicotiana tabacum* var. Maryland Mammoth)とダイズ(*Glycine max*)を用いた研究によって、日長条件が花芽誘導を制御する主要な要因の一つであることをより明確に示し、植物が日長に反応することを光周性(photoperiodism)と名付けた。

短日植物であるオナモミの類縁種 *Xanthium pennsylvanicum* において、花成誘導は明期の長さより暗期の長さが重要であり、連続誘導暗期中の光照射は花成を阻害することが明らかになった(Hamner and Bonner, 1938)。また、長日植物のヒヨス(*Hyoscyamus niger*)において、長時間の暗期が花芽形成を阻害した(Lang and Melchers, 1943)。これらのことから、短日植物でも長日植物でも暗期の長さが花成誘導にとって重要であると考えられ、多くの植物についても確かめられた。

植物が日長により花成誘導されることが明らかになると、次にそれを受感する器官

がどこであるかが検討された。Garner と Allard (1925)は、コスモス(*Cosmos* sp.)を用いて日長が葉で感受されていることを最初に示した。Knott (1934)はホウレンソウ(*Spinacia oleracea*)の茎頂のみを日長処理しても花成が誘導されないことから光周期を感受するのは茎頂ではなく葉であることを示唆した。また、*X. pennsylvanicum* (Hamner and Bonner, 1938)やアカザ(*Chenopodium rubrum*) (King, 1972)を用いた実験で、葉をすべて取り除いた時、短日処理を行っても花芽を形成しないが、葉が一枚でもあれば花芽が形成されることが報告されている。シソ(*Perilla crispa*)においては、短日処理をした葉を切り取り、非誘導植物体に接ぐことでその植物体に花芽ができることが報告された(Zeevaart, 1958)。これらのことから光周性を感受している器官は葉であると考えられた。

日長を感受する器官は葉であるが、花芽は茎頂において形成される。このことから、Knott (1934)は誘導日長によって葉で作られた物質が茎頂に移動して花芽形成を誘導していると推測した。このことはダイズ(Kuijper and Wiersum, 1936)、ヒマワリ(*Helianthus annuus*)、シソ(Chailakhyan, 1936)などの植物を用いた接木実験によって示された。Chailakhyan (1937)は、このように葉から茎頂へ移動して花成を制御する物質は一種の植物ホルモンであると推定し、この仮想物質にフロリゲン(花成ホルモン)という名称を与え、フロリゲンはすべての短日植物に共通であるとした。

WithrowとWithrow (1943)は茎を環状剥離して篩管を取り除いた植物体の葉に短日処理を行った場合、茎頂で花芽形成が見られないことから、花成を誘導する物質は篩管を移動していることを示した。また、蒸気で葉柄を殺した場合にも花成が見られなかったことから生きた細胞内しか移動しないことなども示した。ニホンアサガオ(*Pharbitis nil*)において、短日処理をした葉から茎頂への同化産物の移動量と花成反応との関係が調べられ、その相関関係が示された(King et al., 1968)。また、シソにおいても同様の相関関係が見られた(King and Zeevaart, 1973)。さらに、ニホンアサガオにおいて、花成誘導物質の移動速度と同化産物の移動速度がほぼ同じであると報告された(Takeba and Takimoto, 1966)。これらのことから、花成誘導物質は篩管中を同化産物と共に移動すると考えられた。しかし、長日植物であるドクムギ(*Lolium*

temulentum)においては、花成誘導物質の篩管中の移動速度は同化産物の移動速度とは異なっており、同化産物と独立して移動しているとも考えられる(Evans and Wardlaw, 1964). 花成誘導物質が同化産物と共に移動しているのかどうかは不明であるが、花成誘導物質が篩管中を移動することは明らかである.

2 花成誘導物質

花成に関する研究は、花芽形成を誘導する物質(誘導日長によって生成される)を明らかにすることに重点がおかれ、その誘導物質を単離しようとする試みが数多くなされてきた。短日植物は限界暗期より長い暗期を与えることで花芽を形成するため、花成研究に有利な材料である。HamnerとBonner (1938)は、短日植物である*X. pennsylvanicum*の誘導処理した植物体から実際に花成誘導物質を単離しようと試みた。彼らは、短日処理した葉から水や有機溶媒を用いて抽出を行い、その抽出物を非誘導植物体の枝に与えて花成誘導活性を調べたが活性は検出されなかった。ワシントンヤシ(*Washingtonia robusta*)において、初めて植物からの抽出物の花成誘導活性が検出された。ワシントンヤシの花穂からの水による抽出物をstem-flap法を用いて短日植物のオオオナモミ(*X. canadense*)に与えると長日条件下で花芽が形成された(Bonner and Bonner, 1948)。この水抽出物は熱処理により活性が著しく低下したので、花成誘導物質は熱に不安定なものだと考えられた。Lincolnら(1961)は、開花中のオナモミ(*X. strumarium*)からのメタノールによる抽出物をラノリンペーストにして非誘導のオナモミの葉面に塗布することで花成を誘導することに成功した。この物質はある程度まで精製され、有機酸の一種と推測されたが同定には至らなかった(Mayfield et al., 1963; Lincoln et al., 1964)。他にも植物からの抽出物の花成誘導物質として、短日性のキク(*Chrysanthemum* sp.)からのステロール様の物質(Biswas et al., 1966)、長日植物のヒヨスとサルビア(*Salvia splendens*)及び短日植物のアカザとシソからのエストロゲン様物質(Kopcewicz, 1971, 1972a, 1972b; Kopcewicz and Porazinski, 1974)が報告されている。

植物からの抽出物を調べるために用いられた検定系はstem-flap法(Bonner and Bonner, 1948), 葉面塗布(Lincoln et al., 1964), 葉面散布(Biswas et al., 1966), 茎頂滴下(Chailakhyan et al., 1989)など植物体を使う方法であった。しかし, 植物体そのものを検定系に用いると, 検体数が限られ, 栄養条件などの外的要因や他の器官の影響なども受けるため明確な結果が得られにくい。そのため, 植物の抽出物を簡単に与えることができ, 一度に多量の検定が可能な方法としてウキクサ類が用いられるようになった。HodsonとHamner (1970)は開花期のオナモミからのアセトンによる抽出物をオナモミとアオウキクサ(*Lemna paucicostata* st. 6746)に与えて花成誘導効果を調べた。その結果, アオウキクサでは花成が誘導されたが, オナモミでは花成は誘導されなかった。Fujiokaら(1986, 1987)は, 開花中のアオウキクサ(st. 151とst.381)と長日性のイボウキクサ(*L. gibba* st. G3)からのアセトン抽出物は短日性のアオウキクサ(st. 151)の花成を誘導し, その花成誘導物質についてイボウキクサからの活性物質はニコチン酸, L-ピペコリン酸, ニコチンアミド, そしてアオウキクサからの活性物質はニコチン酸であると報告した。だが, いずれの物質もいわゆるフロリゲンであるという確証は得られていない。アオウキクサ(st. 441)において, 短日処理された植物体からの水抽出物は花成誘導活性があり(Takimoto et al., 1989), その活性物質は熱に安定な物質で, ノルエピネフィリンの酸化反応によって生成されると報告された(Takimoto and Kaihara, 1990; Takimoto et al., 1991; Kaihara and Takimoto, 1991)。しかし, 非誘導のアオウキクサの抽出物からも同じような活性が得られるため, この物質はアオウキクサにおいて花成に関係はあるが光周刺激によって生成される花成誘導物質ではないと考えられた。

高分子性の花成誘導物質の存在も報告されている。非誘導のアオウキクサ(st. 441)の水抽出物から高分子性の花成誘導物質が得られた(Takeba et al., 1990)。この高分子性の物質は分子量が約120 kDaltonのタンパク質であり, その分解産物である約20 kDaltonのポリペプチドが花成誘導活性を保持していると考えられた(Kozaki et al., 1991)。長日植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて *fy*, *fpa*, *fve*, *fca*, *fe*, *ft* 等のような多数の花成遅延突然変異体が作出された

(Koorneef et al., 1991). これらのうち, *FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子については同定され(Kobayashi et al., 1999), FTタンパク質が花成を誘導するために茎頂で作用することが証明された(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). また, 短日植物であるイネ(*Oryza sativa*)においても, FTのイネにおけるオーソログである *Heading date 3a (Hd3a)* 遺伝子が同定され, Hd3aタンパク質が葉から茎頂へ移動することが報告された(Tamaki et al., 2007; Mathieu et al., 2007). 同様にFT相同タンパク質が中性植物のトマト(*Solanum lycopersicon*) (Lifschitz et al., 2006), 短日植物のニホンカボチャ(*Cucurbita moschata*), 中性植物のセイヨウカボチャ(*C. maxima*) (Lin et al., 2007), 短日植物のニホンアサガオ(Hayama et al., 2007)などで報告されている. しかし, これらのFTタンパク質やFT相同タンパク質が篩管を經由して長距離移動していることを示す直接的な証拠はなく, より明確に篩管を經由して茎頂に到達していることを証明する必要がある.

花成誘導物質の単離方法として多くは組織を粉碎したり, 有機溶媒による抽出であったりしたが, 花成誘導物質は葉で作られ篩管を經由して移動するため, 篩管液を採取してその花成誘導活性を調べるという試みもなされてきた. Cleland (1974)は, アリマキが植物の篩管液を吸った後, その尾部から蜜液を出すことから, この蜜液には篩管液が含まれていると考えた. そこで, 開花中のオナモミに吸液しているアリマキから蜜液を採取した. 採取した蜜液は長日植物のイボウキクサ(st. G3)において花成誘導活性を示し, その活性物質はサリチル酸であると同定された. また, サリチル酸の添加によってイボウキクサの花成が誘導された(Cleland and Ajami, 1974). しかし, 非誘導のオナモミに吸液しているアリマキから採取した蜜液にもサリチル酸が検出され, サリチル酸は短日処理によってのみ生成される物質ではないことを示唆している. Purse (1984)は短日処理したシソの葉から採取した篩管液には花成誘導活性があることを示した. しかし, 非誘導のシソの葉から採取した篩管液にもある程度の花成誘導活性があり, この活性は短日処理に特異的なものではなかった. ニホンアサガオにおいて, 短日処理をした実生の子葉から採取した篩管液はニホンアサガオの培養茎

頂の花成を誘導した(Ishioka et al., 1990, 1991). この篩管液中の花成誘導物質は部分精製され, いくつかの化学的特性が明らかにされた(Kondoh et al., 1999).

短日植物において花成誘導物質の単離のために多くの研究が行われているが, 長日植物においても花成誘導物質を明らかにしようとする試みが行われている. 長日植物であるドクムギ(Evans and Wardlaw, 1964)やムシトリナデシコ(*Silene armeria*) (Wellesick, 1966)では, 葉から茎頂へ移動する花成誘導物質が示された. また, ドクムギ(Evans, 1964), ヒヨス(Lang, 1957), ルドベキア(*Rudbeckia speciosa*) (Nitsch and Harada, 1958), ホウレンソウ(Wittwer and Bukovac, 1957), シロイヌナズナ(Langridge, 1957)ではジベレリンの添加によって花芽が誘導されることが報告されている. これらの結果から, 長日植物の花成誘導物質はジベレリンであると考えられたが, Warm (1980)はジベレリン処理によって植物体は抽臺するが花芽を形成するのはそのうちの60%でしかないと報告した. また, *Rudbeckia bicolor*の器官切片からの再分化個体における花芽形成にはジベレリン処理とともに長日条件での培養が必要であった(Tanimoto and Harada, 1982). これらのことから, 長日植物の花成誘導はジベレリンのみでなく他の何らかの物質が関与していると考えられる.

3 花成阻害物質

花成誘導に関する研究を進めているうちに, 非誘導葉が存在することにより花成が阻害されることがわかってきた. この非誘導による花成阻害はドクムギ(Evans, 1960), イチゴ(*Fragaria ananassa*) (Guttridge, 1959), カランコエ(*Kalanchoe blossfeldiana*) (Hander et al., 1949), シソ(King and Zeevaart, 1973), オナモミ(Lincoln et al., 1956), ニホンアサガオ(Imamura, 1961; Ogawa and King, 1979)などの多くの植物で報告されている.

オナモミでは, 花成の阻害が起こるのが茎頂と誘導葉の間に非誘導葉が存在するときのみであったため, 誘導葉で生成された花成誘導物質の輸送を非誘導葉が抑制することにより花成阻害が起こると考えられた(Gibby and Salisbury, 1971).

Zeevaartらは、シソ(King and Zeevaart, 1973)及びオナモミ(Zeevaart et al., 1977)を用いた実験で、誘導葉から茎頂への同化産物の輸送量が著しく減少すると、花成の阻害が見られると報告した。また、ニホンアサガオにおいて、非誘導葉にサイトカイニン的一种であるベンジルアデニンを処理して同化産物の輸送を妨げると花成が促進され、逆に誘導葉に処理すると花成が阻害された(Ogawa and King, 1979)。さらに、ニホンアサガオにおいて、子葉のうちの1枚で非誘導の面積を変えることにより、もう一方の誘導された子葉から茎頂へ輸送される同化産物の到達量の変化と花成阻害効果の関連性が示され、非誘導葉の面積が減少するに従って誘導葉から茎頂への同化産物の到達量が増加し、形成される花芽数が増加したと報告された(Ogawa and King, 1990)。これらのことから、非誘導葉による花成の阻害は、非誘導葉の茎頂への同化産物の供給量が増えることにより誘導葉から茎頂への同化産物と共に輸送される花成誘導物質の移動量が減少するためであると推測され、共輸送阻害説と呼ばれた。

しかしながら、PapafotiouとSchwabe (1990)はオナモミとカランコエを用いて、非誘導葉の光合成を阻害しても花成阻害効果は減少しないこと、また、誘導葉の光合成量は花成誘導に影響がないことを明らかにした。これらの結果から、花成の阻害は非誘導葉で生成された花成阻害物質によって起こると彼らは結論づけている。

実際に、花成阻害物質が非誘導葉で生産されていることを示唆するいくつかの報告がある。短日性のイチゴを用いた実験では、長日条件下の葉(非誘導葉)で花成阻害物質が作られ、ストロンを通じて移動し、そして成長領域で作用することが示された(Guttridge, 1959; Vince-Prue and Guttridge, 1973)。また、接木による実験で花成阻害物質の存在がより明確に示された。Langら(1977)は、中性のタバコ(ver. Trapezond)を台木に用いて長日性の*Nicotiana silvestris*を接ぎ、短日条件下で育てることで台木の花成が著しく抑制されることを示した。このことから、長日性の*N. silvestris*は花成阻害物質を生成し、それは台木にまで移動すると考えた。

非誘導葉で花成阻害物質が作られるという報告が認められるに従い、花成阻害物質の単離が試みられるようになった。Schwabe (1972)は短日植物であるカランコエ

において、長日条件下で育てられた植物体の葉からの抽出物は短日処理をした植物体において花成を阻害したと報告した。また、Blake (1972)は長日条件下で育てたカラコエのエタノール抽出物が長日植物である *Viscaria candida* の培養茎頂に対して花成阻害効果を示すことを見いだした。この阻害効果を示す物質はPryce (1972)により、gallic acidであると同定された。また、gallic acidの添加は *V. candida* の花成を阻害した。しかし、花成阻害効果を示すには極めて高い濃度が必要であり、カラコエの非誘導葉による花成阻害効果はgallic acid単独の効果ではなく、他の物質との共同効果であろうと推測している。ニホンアサガオにおいて、連続照明下で育てられた実生の子葉から採取した篩管液は花成を誘導された実生から切り取った茎頂を培養した場合に花成を阻害した(Ishioka et al., 1990)。このことから、この篩管液中には花成阻害物質が含まれていると考えられる。この篩管液中の花成阻害物質は部分精製され、いくつかの化学的特性が明らかにされたが単離・同定には至っていない(Kondoh et al., 1999)。

4 FTタンパク質

FTタンパク質は種子植物において汎用的な長距離シグナルである可能性があるとされている。*FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子は、長日植物シロイヌナズナの日長による花成制御経路において、*CONSTANS (CO)* 遺伝子の下流で働く強力な花成促進因子として同定された(Kardailsky et al. 1999, Kobayashi et al. 1999)。そして、FTタンパク質は約20 kDaltonの水溶性タンパク質で、哺乳類で最初に発見されたホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質(phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP)ファミリーに属する。

CO 遺伝子や *FT* 遺伝子のプロモーター配列に *GUS* 遺伝子を融合させたコンストラクトをシロイヌナズナに導入し、その発現部位を解析することで、*CO* 遺伝子とその直接の制御標的である *FT* 遺伝子は、ともに葉の維管束の篩部で発現していることが判明した(Takada and Goto, 2003)。続けて、Anらも維管束における *CO* 遺伝子の発現を確

認した上で, *co*変異体においてCO遺伝子を組織的に発現させて相補能を検討した. すると, 篩部特異的に発現させた場合は過剰発現体と同程度の早咲き表現型を示したが, 茎頂特異的に発現させた場合には*co*変異体と同程度の遅咲き表現型を示した. このことは, COタンパク質の機能が必要とされる組織は茎頂ではなく維管束であるあるということを示唆した. さらに, 篩部特異的なCO遺伝子の発現による早咲き効果は, *ft*変異により部分的に失われることや, CO遺伝子の下流の遺伝子, おそらくはFT遺伝子が, 接木伝達性を持つ花成シグナルの生成に関わっている可能性が考えられるようになった(An et al., 2004).

FT遺伝子の下流で機能する因子の遺伝的な探索(Abe et al., 2005)とFTタンパク質とタンパク質間相互作用する因子の探索(Wigge et al., 2005)からそれぞれFLOWERING LOCUS D (FD)遺伝子にたどり着いたことで, FT遺伝子が接木伝達性の花成シグナルの生成に関わっているという方向性が強くなった. FD遺伝子はbZIP型転写因子をコードしており, 茎頂部及び根端部で発現するが, 維管束では発現しない(Abe et al., 2005). ベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)の表皮細胞における一過的発現系を用いて, 植物細胞内においてFDタンパク質はFTタンパク質と核内で相互作用することが示され(Abe et al., 2005), さらに両者が共に働くことによりAPETALA1 (AP1)遺伝子やFRUITFULL遺伝子といった下流の遺伝子が発現することも明らかになった(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). FT遺伝子はCO遺伝子と異なり, 本来の発現場所である篩部特異的に発現させた場合にも, *co*変異体や*ft*変異体の遅咲き表現型, *ft*; *lfy*二重変異体の遅咲き・花芽形成不完全表現型を補うことができる(An et al., 2004; Abe et al., 2005). こうして, シロイヌナズナにおいてFTタンパク質が機能する主たる部位は茎頂であることが明らかになったことにより, 葉の篩部で発現しているFT遺伝子がフロリゲンをコードする可能性が強まった.

Corbesiterらは, シロイヌナズナにおいてSUC2プロモーターにより篩部の伴細胞特異的にFT:GFP融合遺伝子を*ft*変異体で発現させ, 融合遺伝子のmRNAとGFP蛍光の局在を観察した. すると, mRNAは茎頂分裂組織や原生篩部では検出できなかったが, GFP蛍光は花成が起こる頃合いの植物体(10日齢)において原生篩部及び茎

頂分裂組織の基部に検出することができた。この形質転換植物は、ロゼット葉数を指標に見た場合に、野生型並の花成時期に回復しており、また、融合タンパク質の分解は確認されないため、FT:GFP融合タンパク質の篩部組織から茎頂分裂組織基部への輸送が花成と関連していると考えられた。また、彼らは、篩部特異的に発現させたFT:GFP融合タンパク質が接木面を通過し、花成を促進しうることを示した。一方、*SUC2*プロモーターでなく、ソース葉の末梢維管束の篩部特異的な*GAS1*プロモーターを用いて融合タンパク質を発現させた場合には、花成は促進されず、また、GFP蛍光も*GAS1*プロモーターによる発現部位である末梢維管束にとどまっていた。このため、*FT*遺伝子の下流因子ではなく、*FT*タンパク質そのものが茎頂分裂組織付近まで輸送されることにより花成が起こっていると結論づけられた(Corbesiter et al., 2007)。また、Tamakiら(2007)は短日植物であるイネを用いて、イネにおいて*FT*遺伝子に相当する*Hd3a*遺伝子のmRNA量は茎頂部では葉身に比べて極度に低いことを示した上で、篩管特異的にHd3a:GFP融合タンパク質を発現させて、前述のCorbesiterらと同様の結果を報告した。JaegerとWigge(2007)は、シロイヌナズナにおいて、N末端に5つのMycタグを連結させたFTタンパク質(MycFTタンパク質)を*SUC2*プロモーターにより*ft*変異体で発現させ、*SUC2*プロモーターで発現させた場合には、変異体同様の遅咲きになり、Myc NLS FTタンパク質は伴細胞の核のみ検出されることを示した。CaMV35Sプロモーターで植物体全体にMyc NLS FTタンパク質を発現させた場合には早咲きになることから、FTタンパク質そのものが標的細胞まで移動することにより、花成が起こると結論づけられた。

一方、Mathieuらは、シロイヌナズナにおいて、人工miRNAを茎頂部及び維管束篩部特異的に発現させることにより、各部位の*FT*遺伝子のmRNA量を減少させ、篩部特異的に減少させた場合にのみ花成時期に影響が出ることを示した(Mathieu et al., 2007)。その上で、彼らは3つのYELLOW FLUORESCENCE PROTEIN (YFP)を融合させたFTタンパク質を篩部特異的に発現させた。この融合タンパク質はTobacco Etch Virusのプロテアーゼ(TEVP)の認識部位をYFPとFTタンパク質との間に有しており、植物体内においては、TEVPが発現している部位でのみ、YFPからFTタンパク

質が切り離される。すると、TEVPが発現していない場合には野生型と花成時期は変わらなかったが、篩部特異的にTEVPを発現させた植物と掛け合わせることによって得られたF1植物は、35Sプロモーターで融合タンパク質を発現させた場合と同じく早咲きになった。このため、彼らは篩部の伴細胞からのFTタンパク質の輸送が花成を起すのに十分であると結論づけた。

これらに対して、Linらは、実験植物としてニホンカボチャのPI441726株及びセイヨウカボチャを用いて、篩管液からFTタンパク質に相当するタンパク質を検出することに成功した(Lin et al., 2007)。前者は絶対的短日植物、後者は中性植物であり、共に2種類のFT相当遺伝子をもつ。これらがコードするタンパク質は、アミノ酸配列が部分的に異なるため、高精度のスペクトル解析に区別することが可能である。そして、カボチャ属植物には接木実験が容易であり、篩管液を集めやすいというメリットがある。彼らは、まず、長日条件においたニホンカボチャに、シロイヌナズナのFT遺伝子を組み込んだZucchini yellow mosaic virusを感染させることで、非誘導日長でも花成が起ることを示した。このウイルスはポチウイルスの1種で、いったんポリタンパク質が作られた後に各タンパク質が切り出されるため、FTタンパク質単独のmRNAができないというメリットがある。ウイルスはそもそも茎頂へは侵入できないことが知られており、この実験でもウイルスの痕跡が検出されないことを示した。さらに、セイヨウカボチャを台木、ニホンカボチャを接穂にして接木を行うと、長日条件で接穂が花成し、この接木植物の篩管液中には、セイヨウカボチャのFTタンパク質が検出された。これらから、彼らはカボチャ属植物においてFTタンパク質がフロリゲンとして機能するという結論を導き出した。こうした複数の研究結果を総合すると、FTタンパク質そのものが葉の維管束篩部伴細胞から茎頂付近にまで篩管を通して輸送されることにより花成が起るという結論を導き出すことができる。しかし、シロイヌナズナでは、FTタンパク質と相互作用して機能するFDタンパク質の存在する茎頂分裂組織(Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005)において、FTタンパク質などを明瞭に検出することはできていない(Corbesier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007)。イネのHd3a:GFP融合タンパク質の茎頂分裂組織本体における検出(Tamaki et al., 2007)は報告されているが、

Hd3aタンパク質の茎頂における機能はまだよくわかっておらず、茎頂本体におけるFTタンパク質の検出は今後の課題となっている。

FTタンパク質が篩部伴細胞で翻訳されてから茎頂までの輸送に関して、GFP融合タンパク質を用いた篩管への移行と篩管からの移行に関する解析によると、原形質連絡を介した伴細胞から篩管要素への移行のサイズ排除限界は67 kDalton以上であると報告がある(Stadler et al., 2005)。これに基づくと、約20 kDaltonのFTタンパク質や約47 kDaltonのFT:GFP融合タンパク質は拡散によって原形質連絡を自由に通過することは可能であるといえる。しかし、ニホンカボチャでは、非誘導日長条件(長日)でもFTタンパク質は転写され、そのタンパク質も維管束組織において少量ながら検出されているものの、篩管液中のFTタンパク質は誘導日長条件(短日)でしか検出できていない(Lin et al., 2007)。また、トマトにおいて、*SFT*遺伝子の過剰発現体の台木に*uniflora*(*uf*)変異体の接穂をしても、台木の過剰発現体の葉を全て切り落とした場合には、*uf*変異体は花成しない(Lifschitz et al., 2006)。シロイヌナズナのCO遺伝子を過剰発現させたジャガイモ野生種(*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*)の形質転換植物においても同様の報告がなされている(Martinez-Garcia et al., 2002)。これらの結果から、日長などが適切な条件下にある葉の篩部伴細胞からのみFTタンパク質の積み込みが行われている可能性が示唆された。

篩管内の移動に関しては、Corbesierらの接木実験でFT:GFP融合タンパク質は接穂から胚軸と根のみの台木へと接木面を通過して移行していることが観察されているため(Corbesier et al., 2007)、FTタンパク質の輸送方向に極性は存在しないと考えられている。しかし、篩管液内のタンパク質間相互作用によって移動方向が制御されるという報告もある(Aoki et al., 2005)。したがって、FTタンパク質も適切な条件下では茎頂へと方向性をもって能動的に輸送される可能性も否定できない。

茎頂内におけるFTタンパク質の移動に対して直接示唆を与える知見はまだ得られていない。茎頂において、L1層特異的にLEAFY:GFP融合タンパク質(74 kDalton)を発現させた場合に、L2, L3層まで単純拡散による移動が観察された(Wu et al., 2003)。茎頂内の単純拡散による移動はAP1などのように核あるいは小胞体にのみ

局在するタンパク質や原形質連絡を通過不可能な大きさを形成するタンパク質では生じず、またL1層内、L2層内の移動は難しいとされた(Wu et al., 2003). 一方、トウモロコシのホメオドメインタンパク質KNOTTES1 (KN1)は、原形質連絡のサイズ排除限界を自ら広げることにより隣接細胞へと移動することが確認された(Kragler et al., 2000). 実際、*kn1*のmRNAの発現場所はL3層に限定されるが、タンパク質は茎頂全体で検出できた(Jackson et al., 1994; Smith et al., 1992). FTタンパク質と同じPEBP族のタンパク質であり、生理的にはFTタンパク質とは逆の機能を担っているTERMINAL FLOWER1 (TFL1)タンパク質(Bradley et al., 1997; Kobayashi et al., 1999; Kardailsky et al., 1999)は、mRNAの発現場所である茎頂のL3層内部から茎頂分裂組織全体へと移動することが確認されている(Conti and Bradley, 2007). この移動は*fy* 変異体では観察されず、野生型においてもTFL1タンパク質は花芽分裂組織には進入しない. このことは、茎頂におけるTFL1タンパク質の移動に関して、単純な移動ではなく、なんらかの積極的な制御が行われていることを示唆しているが、まだ明らかになっていない.

引用文献

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science** 309: 1052-1056.

An, H., Roussot, C., Suarez-Lopez, P., Corbesier, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justine, S., Trnbull, C., Coupland, G. (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induce photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. **Development** 131: 3615-3626.

Aoki, K., Suzuki, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., Sakakibara, H., (2005) Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. **Plant Cell** 17: 1801-1814.

Biswas, P. K., Paul, K. B., Henderson, J. H. M. (1966) Effect of *Chrysanthemum* plant extract on flower initiation in short-day plants. **Physiol. Plant.** 19: 875-882.

Blake, J. (1972) A specific bioassay for the inhibition of flowering. **Planta** 103: 126-128.

Bonner, J., Bonner, D. (1948) None on induction of flowering in *Xanthium*. **Bot. Gaz.** 110: 154-156.

- Bradley, D., Ratcliffe, O. J., Vincent, C., Carpenter, R., Coen, E. S. (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. **Science** 275: 80-83.
- Chailakhyan, M. Kh. (1936) New facts in support of the hormonal theory of plant development. **C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS.** 13: 79-83.
- Chailakhyan, M. Kh. (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. **C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS.** 16: 227-230.
- Chailakhyan, M. Kh., Lonzhnikova, F. S., Krekule, L., Dudko, N., Negretzkt, V. (1989) Floral and growth responses in *Chenopodium rubrum* L. to an extract from flowering *Nicotiana tabacum* L. **Planta** 178: 143-146.
- Cleland, C. F. (1974) Isolation of flower-inducing and flower-inhibitory factors from aphid honeydew. **Plant Physiol.** 54: 899-903.
- Cleland, C. F., Ajami, A. (1974) Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. **Plant Physiol.** 54: 904-906.
- Conti, L., Bradley, D. (2007) TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. **Plant Cell** 19: 767-778.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountia, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G. (2007) FT protein

movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science** 316: 1030-1033.

Evans, L. T. (1960) Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. 2. Evidence for inhibitory and promotive photoperiodic process involving transmissible products. **Aust. J. Biol. Sci.** 13: 429-440.

Evans, L. T. (1964) Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. V. The role of auxins and gibberellins. **Aust. J. Biol. Sci.** 17: 10-23.

Evans, L. T., Wardlaw, I. F. (1964) Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. 4. Translocation of the floral stimulus in relation to that of assimilates. **Aust. J. Biol. Sci.** 17: 1-9.

Fujioka, S., Sakurai, A., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., Takimoto, A. (1987) Isolation and identification of L-pipecolic acid and nicotinamide as flower-inducing substances in *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 28: 995-1003.

Fujioka, S., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., Takimoto, A., Cleland, C. F. (1986) Isolation and identification of nicotinic acid as a flower-inducing factor in *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 27: 103-108.

Garner, W. W., Allard, H. A. (1920) Effects of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. **J. Agr. Res.** 18: 553-606.

- Garner, W. W., Allard, H. A. (1925) Localization of the response in plants to relative length of day and night. **J. Agr. Res.** 31: 555-566.
- Gibby, D. D., Salisbury, F. B. (1971) Participation of long-day inhibition in flowering of *Xanthium strumarium* L. **Plant Physiol.** 47: 784-789.
- Guttridge, C. G. (1959) Further evidence for growth-promoting and flower-inhibiting hormone in strawberry. **Ann. Bot.** 23: 612-621.
- Hamner, K., Bonner, J. (1938) Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. **Bot. Gaz.** 100: 388-431.
- Hander, R., Westphal, M., Behrens, G. (1949) Hemmung der Infloreszenzbildung durch Langtag bei der Kurstagspflanze *Kalanchoë blossfeldiana*. **Planta** 36: 424-438.
- Hayama, R., Agashe, B., Luley, E., King, R., Coupland, G. (2007) A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. **Plant Cell** 19: 2988-3000.
- Hodson, H. K., Hamner, K. C. (1970) Floral inducing extract from *Xanthium*. **Science** 167: 384-385.
- Imamura, S. (1961) The nature of inhibition of flowering by the leaves illuminated continuously during the inductive dark treatment of other leaves in short-day. **Recent Adv. Bot.** 2: 1287-1288.

- Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1990) Flower-inducing activity of phloem exudate in cultured apices from *Pharbitis* seedlings. **Plant Cell Physiol.** 31: 705-709.
- Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1991) Flower-inducing activity of phloem exudates from *Pharbitis* cotyledons exposed to various photoperiods. **Plant Cell Physiol.** 32: 921-924.
- Jackson, D., Veit, B., Hake, S. (1994) Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. **Development** 120: 405-413.
- Jaeger, K. E., Wigge, P. A. (2007) FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. **Curr. Biol.** 17: 1050-1054.
- Kaihara, S., Takimoto, A. (1991) A flower-inducing substance derived from norepinephrine upon contact with intact *Lemna* plant. **Plant Cell Physiol.** 32: 1107-1109.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., Chory, J., Harrison, M. J., Weigel, D. (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. **Science** 286: 1962-1965.
- King, R. W. (1972) Timing in *Chenopodium rubrum* of export of the floral stimulus from the cotyledons and its action at the shoot apex. **Can. J. Bot.** 50: 697-702.

- King, R. W., Evans, L. T., Wardlaw, I. F. (1968) Translocation of the floral stimulus in *Pharbitis nil* in relation to that of assimilates. **Z. Pflanzenphysiol.** 59: 377-388.
- King, R. W., Zeevaart, J. A. D. (1973) Floral stimulus movement in *Perilla* and flower inhibition caused by noninduced leaves. **Plant Physiol.** 51: 727-738.
- Knott, J. H. (1934) Effects of localized photoperiod on spinach. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** 31: 152-154.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science** 286: 1960-1962.
- Kondoh, M., Murakami, A., Shigeta, C., Tanimoto, S. (1999) Flower-inducing and -inhibiting activities of phloem exudate from cotyledons of *Pharbitis* seedlings. **Plant Growth Regul.** 28: 107-116.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., van der Veen, J. H. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.** 229: 57-66.
- Kopcewicz, J. (1971) Estrogens in developing bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Phytochemistry** 10: 1423-1427.

- Kopcewicz, J. (1972a) Oestrogens in the long-day plants *Hyoscyamus niger* and *Salvia splendens* grown under inductive and non-inductive light conditions. **New Phytol.** 71: 129-134.
- Kopcewicz, J. (1972b) Estrogen in the short-day plants *Perilla ocimoides* and *Chenopodium rubrum* grown under inductive and non-inductive light conditions. **Z. Pflanzenphysiol.** 67: 373-376.
- Kopcewicz, J., Porazinski, Z. (1974) Effects of growth regulators, steroids and estrogen fraction from sage plants on flowering of a long-day plants, *Salvia splendens*, grown under non-inductive light conditions. **Biol. Plant.** 16: 132-135.
- Kozaki, A., Takeba, G., Tanaka, O. (1991) A polypeptide that induces flowering in *Lemna paucicostata* at a very low concentration. **Plant Physiol.** 95: 1288-1290.
- Kuijper, J., Wiersum, L. K. (1936) Occurrence and transport of a substance causing flowering in the soya bean (*Glycine max* L.). **Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch.** 39: 1114-1122.
- Lang, A. (1957) The effect of gibberellin upon flower formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 43: 709-717.
- Lang, A., Melchers, G. (1943) Die photoperiodische Reaktion von *Hyosyamus niger*. **Planta** 33: 653-702.

- Lang, A., Chailakhyan, M. Kh., Frolova, I. A. (1977) Promotion and inhibition of flower formation in a day-neutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 74: 2412-2416.
- Langridge, J. (1957) The aseptic culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Aust. J. Biol. Sci.** 10: 243-252.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvares, J. P., Esched, Y. (2006) The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103: 6398-6403.
- Lin, M. K., Belanger, H., Lee, Y. J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K. I., Miura, E., Xoconstle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R. A., Phinney, B., Lough, T. J., Lucas, W. J. (2007) FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. **Plant Cell** 19: 1488-1506.
- Lincoln, R. G., Cunningham, A., Hamner, K. C. (1964) Evidence for florigenic acid. **Nature** 202: 559-561.
- Lincoln, R. G., Mayfield, D. L., Cunningham, A. (1961) Preparation of a floral initiating extract from *Xanthium*. **Science** 133: 756.
- Lincoln, R. G., Raven, K. A., Hamner, K. C. (1956) Certain factors influencing expression of the flowering stimulus in *Xanthium*. Part I. Translocation and inhibition of the flowering stimulus. **Bot. Gaz.** 117: 193-206.

- Martinez-Garcia, J. F., Virgos-Soler, A., Prat, S. (2002) Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene *CONSTANS*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 99: 15211-15216.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., Schmid, M. (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. **Curr. Biol.** 17: 1055-1060.
- Mayfield, D. L., Lincoln, R. G., Hutchins, R. O., Cunningham, A. (1963) Concentration of a floral-inducing entity from plant extracts. **Agr. Food Chem.** 11: 35-38.
- Nitsch, J. P., Harada, H. (1958) Production de fleurs en jours courts par l'alcool furfurylique chez le *Rudbeckia speciosa*. **Bull. Soc. Bot. Fr.** 105: 319-322.
- Ogawa, Y., King, R. W. (1979) Indirect action of benzyladenine and other chemicals on flowering of *Pharbitis nil* Chois. **Plant Physiol.** 63: 643-649.
- Ogawa, Y., King, R. W. (1990) The inhibition of flowering by non-induced cotyledons of *Pharbitis nil*. **Plant Cell Physiol.** 31: 129-135.
- Papafotiou, M., Schwabe, W. W. (1990) Studies on the long-day inhibition of flowering in *Xanthium* and *Kalanchoe*. **Physiol. Plant.** 80: 177-184.

- Pryce, R. J. (1972) Gallic acid as a natural inhibitor of flowering in *Kalanchoe blossfeldiana*. **Phytochemistry** 11: 1911-1918.
- Purse, J. G. (1984) Phloem exudate of *Perilla cirspa* and its effects of flowering of *P. cirspa* shoot explants. **J. Exp. Bot.** 35: 227-238.
- Schwabe, W. W. (1972) Flower inhibition in *Kalanchoe blossfeldiana*. Bioassay of an endogenous long-day inhibitor and inhibition by (+) abscisic acid and xanthoxin. **Planta** 103: 18-23.
- Smith, L. G., Greene, B., Veit, B., Hake, S. (1992) A dominant mutation in the maize homeobox gene, *knotted1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. **Development** 116: 21-30.
- Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K. J., Sauer, N. (2005) Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. **Plant J.** 41: 319-331.
- Takada, S., Goto, K. (2003) TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. **Plant Cell** 15: 2856-2865.
- Takeba, G., Takimoto, A. (1966) Translocation of the floral stimulus in *Pharbitis nil*. **Bot. Mag. Tokyo** 79: 811-814.

- Takeba, G., Nakajima, Y., Kozaki, A., Tanaka, O., Kasai, Z. (1990) A flower-inducing substance of high molecular weight from higher plants. **Plant Physiol.** 94: 1677-1681.
- Takimoto, A., Kaihara, S. (1990) Production of the water-extractable flower-inducing substance(s) in *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 31: 887-891.
- Takimoto, A., Kaihara, S., Hirai, N., Koshimizu, K., Hosoi, Y., Oda, Y., Sakakibara, N., Nagakura, A. (1989) Flower-inducing activity of water extract of *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 30: 1017-1021.
- Takimoto, A., Kaihara, S., Shinozaki, M., Miura, J. (1991) Involvement of norepinephrine in the production of flower-inducing substance in the water extract of *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 32: 283-289.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., Shimamoto, K. (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. **Science** 316: 1033-1036.
- Tanimoto, S., Harada, H. (1982) Physiological and hormonal factors influencing organogenesis in *Rudbeckia bicolor* explants cultured *in vitro*. **Plant Cell Physiol.** 23: 107-113.
- Tournois, J. (1911) Anomalies florales du *Houblon japonais* et du Chanvre déterminées par des semis hatifs. **C. R. Acad. Sci. Paris** 153: 1017-1019.

- Tournois, J. (1912) Influence de la lumière sur la floraison du *Houblon japonais* et du Chanvre. **C. R. Acad. Sci. Paris** 155: 297-300.
- Vince-Prue, D., Guttridge, C. G. (1973) Floral initiation in strawberry: Spectral evidence for the regulation of flowering by long-day inhibition. **Planta** 110: 165-172.
- Warm, E. (1980) Die Wirkung von Phytohormonen und von Salicylsäure auf die Blutbildung und Sprossverlängerung bei der Langtagpflanze *Hyosyamus niger*. **Z. Pflanzenphysiol.** 99: 325-330.
- Wellesick, S. J. (1966) The flower forming stimulus in *Silene armeria*. **Z. Pflanzenphysiol.** 55: 1-10.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. **Science** 309: 1056-1059.
- Withrow, A. P., Withrow, R. B. (1943) Translocation of the floral stimulus in *Xanthium*. **Bot. Gaz.** 104: 409-416.
- Wittwer, S. H., Bukovac, M. J. (1957) Gibberellin effects on temperature and photoperiodic requirements for flowering of some plants. **Science** 126: 30-31.

Wu, X., Dinneny, J. R., Crawford, K. M., Rhee, Y., Citovsky, V., Zambrysky, P. C. (2003) Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. **Development** 130: 3735-3745.

Zeevaart, J. A. D. (1958) Flower formation as studied by grafting. **Meded. Landbouwhogeschool Wageningen** 58: 1-88.

Zeevaart, J. A. D., Brede, J. M., Cetas, C. B. (1977) Translocation patterns in *Xanthium* in relation to long day inhibition of flowering. **Plant Physiol.** 60: 747-753.

第1章 低分子花成誘導物質

第1節 摘要

セイヨウアサガオ(*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blueを材料として、短日処理した子葉からの篩管液の花成誘導活性について調べた。16時間暗期を1回与えた実生の子葉から採取した篩管液は非誘導の実生から切り取った培養茎頂の花成を誘導した。その篩管液を透析し、分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000以上10,000以下の中分子画分、分子量10,000以上の高分子画分の3画分に分けたとき、低分子画分と高分子画分には花成誘導活性があり、中分子画分には花成誘導活性は存在しなかった。低分子画分をさらに分画し、画分中の花成誘導物質の特性を調べた。その物質は熱に安定であり、そして最も高い花成誘導活性は3 µg凍結乾燥重/mLの濃度で培地に添加したときに得られた。溶媒分配とイオン交換クロマトグラフィーの結果からこの物質は極性が高く酸性の物質であり、精製作業により花成誘導活性は3倍から10倍程度増加した。

第2節 緒言

植物の花成は栄養成長から生殖成長への変換を意味し、農業や園芸そして植物育種においてきわめて重要な現象である。短日植物において花成誘導物質の存在を明らかにするために多くの研究が行われてきた。これらの研究のほとんどにおいては、植物からの抽出物が材料として用いられている。HamnerとBonner (1938)は、短日植物である*Xanthium pennsylvanicum*を短日処理し、その植物体の葉から水及び有機溶媒で抽出を行った。その抽出物を非誘導の切り枝に与えることで花成誘導効果を調べたが効果は得られなかった。植物からの抽出物の花成誘導活性を初めて検出したのはBonnerとBonner である。彼らはワシントンヤシ(*Washingtonia robusta*)の花穂からの水抽出物をstem-flap法を用いて短日植物のオオオナモミ(*X. canadense*)に与えることにより長日条件下で花芽が形成されることを報告した(Bonner and Bonner, 1948)。この水抽出物は熱処理により活性が著しく低下したので、花成誘導物質は熱に不安定であると考えられた。Lincolnら(1961)は、開花中のオナモミ(*X. strumarium*)からのメタノール抽出物をラノリンペーストにして非誘導のオナモミの葉面に塗布することで花成を誘導することに成功した。この物質はある程度まで精製され、有機酸の一種と推測されたが同定には至らなかった(Mayfield et al., 1963; Lincoln et al., 1964)。HodsonとHamner (1970)は開花期のオナモミからのアセトン抽出物をオナモミとアオウキクサ(*Lemna paucicostata* st. 6746)に与えることでアオウキクサでは花成を誘導することに成功したがオナモミでは花成は誘導されなかった。Fujiokaら(1986, 1987)は短日性のアオウキクサ(st. 151, st.381)と長日性のイボウキクサ(*L. gibba* st. G3)のアセトン抽出物から花成誘導物質の単離・精製を試みた。彼らは、イボウキクサからはニコチン酸、L-ピペコリン酸、ニコチンアミド、そしてアオウキクサからはニコチン酸に花成を誘導する効果があると報告した。その後、アオウキクサ(st.381, st.441, st.6746)及びイボウキクサにおけるL-ピペコリン酸の花成誘導効果が証明された(Fujioka and Sakurai, 1992)。また、リジンの添加がアオウキクサ(st.151)の花成を誘導し、そのリジンはL-ピペコリン酸に変換することで作用す

ることが示された(Fujioka and Sakurai, 1997). しかし, いずれの物質もいわゆるフロリゲンであるという証拠は得られていない.

これらの花成誘導物質の単離方法として多くは組織を粉碎したり有機溶媒による抽出であったりしたが, 花成誘導物質は葉で作られ篩管を經由して移動することが知られている(Bernier et al., 1981)ため, 篩管液を採取してその花成誘導活性を調べる試みもなされた. Purse (1984)は短日処理したシソ(*Perilla crispa*)の葉から採取した篩管液には花成誘導活性があることを示した. しかし, 非誘導のシソの葉から採取した篩管液にも活性があり, この活性は短日処理に特異的なものではなかった. Hatoriら(1990)は短日処理した短日性のタバコ(*Nicotiana tabacum* st. MC)から採取した滲出液は, タバコの花茎の表皮組織片から分化する花芽数を増加させると報告している. しかし, この滲出液が花成を誘導するのかについては検討していない.

Harada (1967)は*in vitro*培養は検定系としてとても有益であるとしている. *in vitro*培養を用いた検定系は, 微生物により供試物質が破壊されない, 植物体の他の器官からの影響がない, 一定の環境で培養できるなどの利点がある. 特に茎頂は植物ホルモン無添加でも培養することが可能であり, 花成誘導物質の作用点であるので, 検定系として最も有効であると思われる. Ishiokaら(1990, 1991)は短日処理をしたニホンアサガオ(*Pharbitis nil*) st. Violetの実生の子葉から採取した篩管液の花成誘導活性を同じニホンアサガオst. Violetの茎頂培養を検定系として用いることで調べた. その結果, 短日処理した子葉から採取した篩管液は非誘導植物体から得られた培養茎頂の花成を誘導した. この篩管液中の花成誘導物質は部分精製され, 低分子で極性が高く酸性の物質であった(Kondoh et al., 1999).

日長による花成誘導の分子生物学的研究はシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)において多く報告されている(Searle and Coupland, 2004; Corbesier and Coupland, 2005; Imaizumi and Kay, 2006). 花成に関与する遺伝子としてシロイヌナズナにおいてFLOWERING LOCUS T (FT)遺伝子が同定され(Kobayashi et al., 1999), このFTタンパク質は花成を誘導するために茎頂で作用することが証明された(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). また, 短日植物であるイネ(*Oryza sativa*)に

において、FT遺伝子のイネにおけるオーソログである*Heading date 3a (Hd3a)*遺伝子が同定され、Hd3aタンパク質が葉から茎頂へ移動することが報告された(Tamaki et al., 2007; Mathieu et al., 2007). 同様なFT相同タンパク質は中性植物のトマト (*Solanum lycopersicon*) (Lifschitz et al., 2006), 短日植物のニホンカボチャ (*Cucurbita moschata*), 中性植物のセイヨウカボチャ(*C. maxima*) (Lin et al., 2007), 短日植物のニホンアサガオst. Violet (Hayama et al., 2007)などで報告されている。これらのFTタンパク質およびFT相同タンパク質は葉で作られ篩管を通過して茎頂に運ばれると考えられる。シロイヌナズナの接木実験において、FTタンパク質が花成誘導した接穂から非誘導の台木に移動して、台木の茎頂において花成を誘導することが証明されており(Notaguchi et al., 2008), FTタンパク質が篩管を経由して茎頂へ移動することは明らかである。また、FT相同タンパク質が篩管を経由して茎頂へ移動することを示唆する多くの研究がある(Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007; Lin et al., 2007; Hayama et al., 2007). しかしながらいずれも間接的な証拠であって直接的な証拠はまだ得られていない。

ニホンアサガオst. Violetにおいて、短日処理した実生から採取した篩管液には花成誘導活性があることは証明されている(Ishioka et al., 1990; Ishioka et al., 1991; Kondoh et al., 1999). ニホンアサガオst. Violetから採取した篩管液が他の植物において花成誘導効果があるかを調べるため、短日処理したニホンアサガオst. Violetの子葉から採取した篩管液を種の異なるセイヨウアサガオst. Heavenly Blueに与えて花成誘導効果が調べられた。その結果、ニホンアサガオst. Violetから採取した篩管液はセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの花芽形成を誘導し、また、同様に短日処理したセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの子葉から採取した篩管液もまたニホンアサガオst. Violetの花芽形成を誘導した(宮城, 2012). これらの結果から、短日処理した子葉から採取した篩管液中には種を超えて花成誘導を引き起こす物質が含まれていると推測された。その篩管液中の花成誘導物質は低分子物質であるが、篩管液中の高分子物質の花成誘導活性は調べられていない。もし篩管液中に低分子量と高

分子量の花成誘導物質が存在しているならば、両物質間の相関は花成メカニズムの解明においてきわめて重要である。

本章では16時間の暗期を1回与えることにより花成を誘導したセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの子葉から採取した篩管液中の低分子花成誘導物質の分画を行い、その諸特性を調べた。

第3節 材料と方法

1 植物材料

材料として短日植物であるセイヨウアサガオ(*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blueを用いた。種子はタキイ種苗(Kyoto, Japan)から購入した。

2 検定方法(Fig. 1-1)

セイヨウアサガオst. Heavenly Blueの茎頂培養を検定系に用いた。種子を濃硫酸に45分間、時々攪拌しながら浸漬し、その後流水で洗浄した。その種子を次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1%)で20分間滅菌し、その後滅菌水で洗浄した。滅菌後の種子をMurashigeとSkoogの培地(Murashige and Skoog, 1962; 以降MS培地と呼ぶ)に3%シヨ糖, 0.3% Gelrite (Merck, USA)を添加した固形培地に無菌的に播種し、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で6日間栽培した。検定のための茎頂はそれらの実生から採取した。採取した茎頂は5%シヨ糖, 0.3% Gelriteを添加した10 mLのMS培地に置床した。茎頂培養は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で行い、培養4週間後に茎頂から発達した小植物体の頂花を計測し、頂花形成率として表した。実験は1設定区につき13本以上の培養管で行い、3回繰り返した。全ての実験データはLSD検定を用いてANOVAにより分析し、Tukeyの検定により比較した。

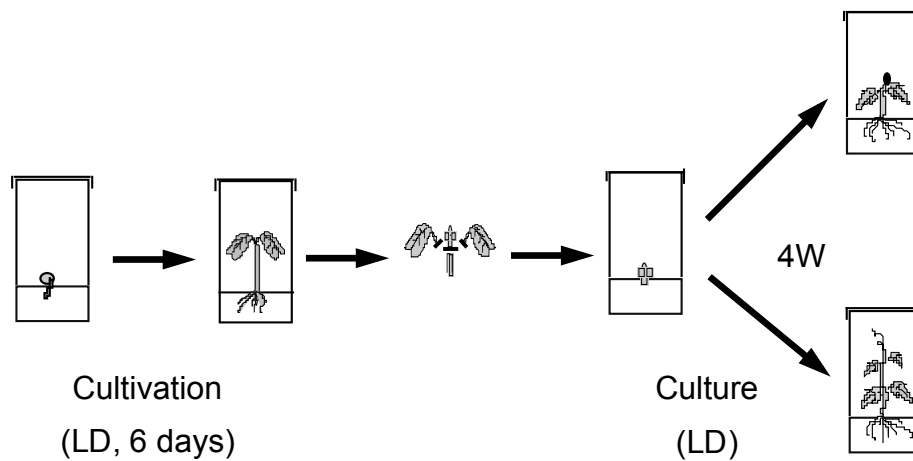


Fig. 1-1 Schematic diagram of apex culture.

Seeds of *Ipomoea tricolor* st. Heavenly Blue were sterilized with a solution of NaOCl, and then sown on MS medium supplemented 3% sucrose and 0.3% Gelrite. They were placed in an incubation room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 6 days. Each apex was excised and cultured on 10 mL of MS medium with 5% sucrose, 0.3% Gelrite and PE or fraction of PE. Apex cultures were maintained under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The developed plantlets were examined for floral bud formation after 4 weeks, and the flowering response was expressed as the percentage of plantlets with a terminal flower.

3 篩管液の採取方法(Fig. 1-2)

種子を濃硫酸で45分間処理した後、流水で水洗した。その種子をバーミキュライトに播種し、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で6日間栽培し、その後、1回の16時間暗期を与え、暗期終了後子葉を切り取った。多くの植物において、葉や茎から篩管液を採取するのは困難である。それは、切断によって篩板の篩孔にカローズやタンパク質性の物質が付着して篩管液の滲出が妨げられるためだと考えられている。KingとZeevaart (1974)はEDTAのようなキレート剤処理が葉柄切断面の篩孔のつまりを防ぐために有効であると報告している。この方法を用いて篩管液を採取した。切り取った子葉の葉柄基部を20 mM EDTA溶液に1時間浸漬し、蒸留水で洗浄後、さらに6時間蒸留水に浸漬した。この蒸留水には篩管液ばかりでなく葉柄切断部からの滲出液も含まれていると思われるが、主要成分は篩管液起源であるとみなし、短日篩管液として扱うこととした。

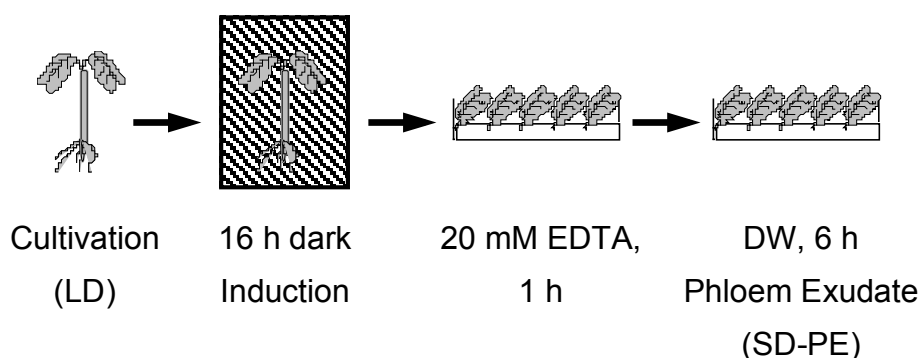


Fig. 1-2 Schematic diagram of phloem exudate collection.

Seeds of *I. tricolor* st. Heavenly Blue were sown on wet vermiculite, cultivated under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 6 days, and then the seedlings were exposed to a single 16 h dark period. For collection of phloem exudate, cotyledons were excised from the seedlings and placed into vials containing 20 mM EDTA. After incubation with EDTA solution for 1 h, the cotyledons were transferred to distilled water and incubated for 6 h. The exudate is referred to as phloem exudate.

4 実生の花成反応に及ぼす暗期の影響

暗期が及ぼす花成反応への影響を調べるために、16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の長日条件下で5日間育てた実生に0, 8, 10, 12, 14, 16時間の暗期を1回与えて、その後1日間育てた。それぞれの実生から茎頂を切り取り5%ショ糖, 0.3% Gelriteを添加した10 mLのMS培地に置床した。それらは引き続き長日条件下で培養し、4週間後、頂花を形成した植物体の割合を調べた。

5 短日篩管液の透析による分画

短日篩管液を凍結乾燥し、残渣を10 mLの蒸留水に溶解した。これを、排除分子量1,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 1,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1 Lの蒸留水に対して12時間4°Cで透析して、透析内液と透析外液に分けた。透析内液は凍結乾燥によって濃縮し、排除分子量10,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 10,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1 Lの蒸留水に対して12時間4°Cで再透析して、透析内液と透析外液に分けた。すべての透析内液と透析外液の画分は凍結乾燥し、残渣の重量(凍結乾燥重)を測定後、少量の蒸留水で溶解した。以上の透析により、分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000-10,000の中分子画分、分子量10,000以上の高分子画分に分画した。30 μg 凍結乾燥重/mLの粗短日篩管液と得られた3画分を用いて花成誘導活性を調べ、低分子画分をその後の実験に用いた。

6 短日篩管液の花成誘導活性における熱処理の影響

花成誘導活性の熱安定性を調べるために、短日篩管液の低分子画分を70°Cまたは100°Cで15分加熱し、フィルター滅菌後、オートクレーブ滅菌した培地に添加した。

また、低分子画分を培地に添加した後、オートクレーブ滅菌することにより121°C、15分の熱処理とした。これらの花成誘導活性を調べた。

7 短日篩管液の溶媒分配による分画

短日篩管液低分子画分中における花成誘導物質の極性を調べるために、低分子画分をクロロホルムと酢酸エチルを用いた溶媒分配によって分画を行った。低分子画分を6規定の塩酸でpH 3に調整した後、等量のクロロホルムを添加してよく攪拌し、分液ロートを用いて水相とクロロホルム相に分画した。その水相に再びクロロホルムを添加し、さらに2回同様に分配して、水相とクロロホルム相を得た。次に得られた水相を6規定の水酸化カリウムで塩基性(pH 12)にした後、再び等量のクロロホルムで3回分配して、水相(画分1)とクロロホルム相(画分2)に分画した。最初のクロロホルム分配で得られたクロロホルム相は5%炭酸水素ナトリウム水溶液(pH 9)を加えて3回分配し、水相とクロロホルム相に分けた。さらに、水相を塩酸で酸性(pH 3)にした後、クロロホルムで3回分配して水相(画分3)とクロロホルム相(画分4)に分けた。もう一方のクロロホルム相は水酸化カリウムで塩基性(pH 12)にした後、炭酸水素ナトリウムで3回分配し、水相とクロロホルム相(画分5)に分け、水相は塩酸で酸性(pH 3)にした後、クロロホルムで水相(画分6)とクロロホルム相(画分7)に分けた。このようにしてクロロホルムを用いた溶媒分配によって計7画分を得た。

クロロホルムでの分配により得られた花成誘導活性がある画分(画分1)はさらに酢酸エチルを用いた溶媒分配によって同じように分画し、計7画分(画分8~14)を得た。溶媒分配の際、クロロホルム画分及び酢酸エチル画分はエバポレーターにより減圧・乾固して、メタノールに溶解し、水相は濃縮した。溶媒分配によって最終的に得られたすべての画分は凍結乾燥し、凍結乾燥重を測定した。そして、それぞれの画分の花成誘導活性を調べた。溶解に用いたメタノールによって花成が誘導されることはなかった。

8 短日篩管液のイオン交換樹脂による分画

溶媒分配による分画で花成誘導活性があった画分(画分8)をイオン交換樹脂により分画した。まず、凍結乾燥した画分8を10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に溶解し、陰イオン交換樹脂カラム(DEAE Sephacel™, 1.5 × 14 cm, 25 mL bed volume; GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden)に吸着させ、同じ緩衝液を用いた洗浄液をFlow through画分とした。吸着した画分は1 MのNaClを含む同じ緩衝液により溶出し、5 mLずつ集め、画分1~8を得た。得た画分をそれぞれ培地に添加して花成誘導活性を調べた。

陰イオン交換樹脂に吸着しなかった画分(Flow through画分)はエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥し、10 mM リン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、陽イオン交換樹脂カラム(CM Cellulose, 1.5 × 14 cm, 25 mL bed volume; Whatman, Kent, UK)に吸着させ、同じ緩衝液を用いた洗浄液をFlow through画分とした。吸着した画分は1 MのNaClを含む同じ緩衝液により溶出し、5 mLずつ集められ、画分1~10を得た。得た画分の花成誘導活性を調べた。10 mM Tris-HCl緩衝液、10 mM リン酸緩衝液及び溶出に用いたNaClによって花成が誘導されることはなかった。

9 短日篩管液のSep-Pak C18 cartridgeによる分画

陽イオン交換樹脂による分画で活性の得られた画分(画分4~6)をSep-Pak C18 cartridge (Waters, MA, USA)により分画した。画分4~6をエバポレーターにより減圧・乾固し、0.1%の酢酸を含む蒸留水に溶解後、Sep-Pak C18 cartridgeに添加し、0.1%の酢酸を含む0, 10, 20, 25, 30, 50, 75, 100%のメタノール100 mLで順次溶出した。すべての画分はエバポレーターにより減圧・乾固し、蒸留水に溶解後、花成誘導活性を調べた。

10 短日篩管液の花成誘導活性と濃度の相関

これまでの精製作業により得られた画分の精製程度を確認するために、短日篩管液の濃度と花成誘導活性の相関について調べた。はじめの透析で得られた透析外液(低分子画分)とSep-Pak C18 cartridgeによる分画で活性が得られた20%と25%メタノール溶出画分を0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μg 凍結乾燥重/mL培地に添加して花成誘導活性を調べた。

第4節 結果

1 実生の花成反応における暗期の影響

暗期に対する花成反応を調べるために、様々な暗期を与えた実生から茎頂を切り取り、長日条件下で培養した。その結果(Fig. 1-3)、暗期処理10時間までは花成は誘導されず、12時間から14時間の暗期処理では弱い花成反応が見られた。16時間の暗期処理において約70%の最も高い頂花形成率を示した。

2 短日篩管液の透析による分画

短日篩管液を排除分子量1,000の透析膜で透析し、その透析内液を凍結乾燥で濃縮後、排除分子量10,000の透析膜で再透析した。得られた分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000-10,000の中分子画分、分子量10,000以上の高分子画分の3画分の花成誘導活性を調べた。低分子画分と高分子画分では花成誘導活性が認められたが、中分子画分に花成誘導活性は存在しなかった(Fig. 1-4)。

3 短日篩管液低分子画分の花成誘導活性における熱処理の影響

短日篩管液低分子画分における花成誘導活性の熱安定性を調べるために、低分子画分を様々な温度で熱処理した。Fig. 1-5に示したように、熱処理によって低分子画分の花成誘導活性に変化はなく、オートクレーブによる熱処理(121°C, 15分)によっても活性は減少しなかった。

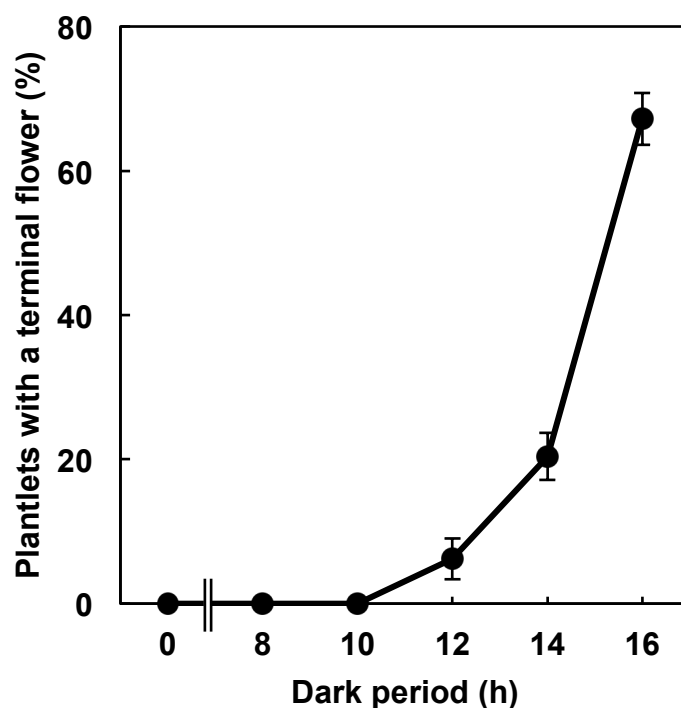


Fig. 1-3 Effect of dark period on flowering response of cultured apices from *Ipomoea tricolor* seedlings.

The seedlings were cultivated for 5 days under a 16 h light/8 h dark (LD) condition, then exposed to various dark periods and then cultivated for 1 day. The apices for bioassay were excised from these seedlings. They were subsequently cultured under the LD condition. After 4-week culture, the percentage of plantlets with a terminal flower was observed. Means \pm SE, n = 13.

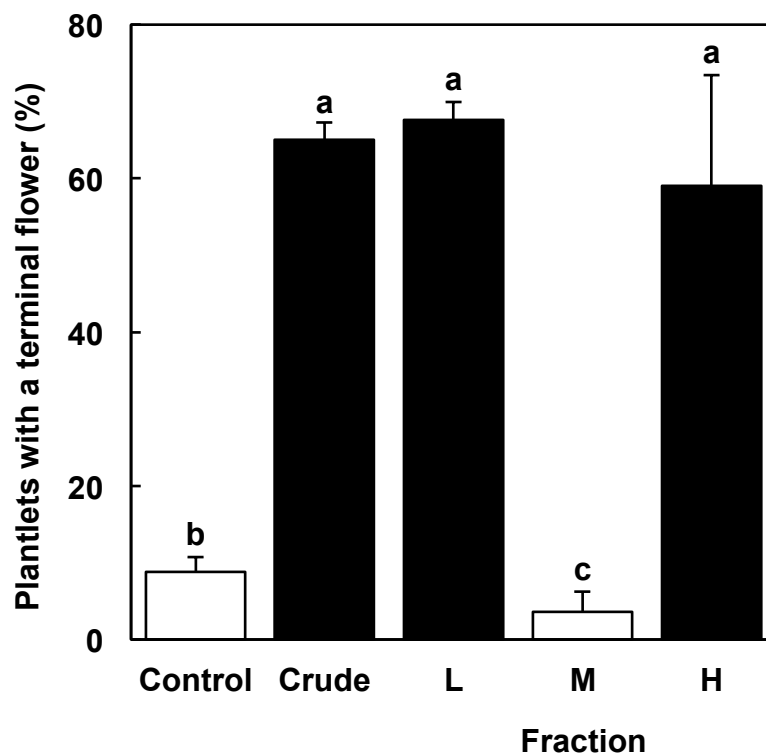


Fig. 1-4 Flower-inducing activities of fractions separated by dialysis.

The phloem exudate was prepared from short day-treated cotyledons (SD-PE). Using $30 \mu\text{g FDW mL}^{-1}$ of the crude SD-PE and low (L), middle (M) and high (H) molecular weight fraction, flower-inducing activity was examined. Culture medium without SD-PE or fraction separated from SD-PE was used as a control. FDW means freeze-dry weight. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

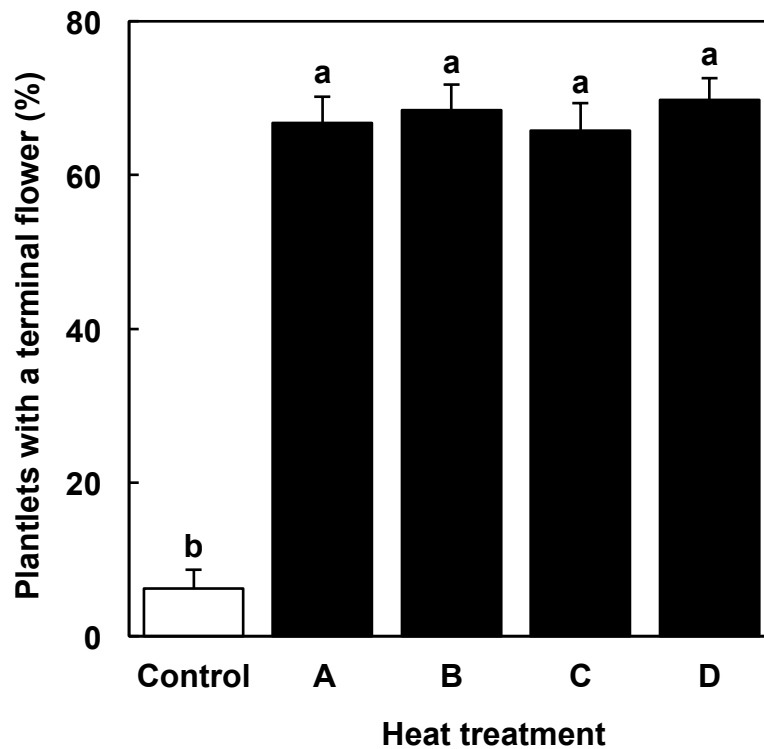


Fig. 1-5 Effect of heat treatment on the flower-inducing activity of phloem exudate (SD-PE).

The phloem exudate was prepared from short day-treated cotyledons (SD-PE). The diffusate fraction from the first dialysis of the SD-PE was heated at 70°C (B), 100°C (C) or 121°C (autoclaving) (D). A; No heat treatment. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

4 短日篩管液低分子画分の溶媒分配による分画

短日篩管液低分子画分をクロロホルムと酢酸エチルでの分配によって分画し、花成誘導活性を調べた。低分子画分をクロロホルムで分配し、得られた画分1～7の花成

誘導活性を調べた。その結果(Fig. 1-6), 水相画分である画分1に花成誘導活性は局在した。

クロロホルム分配によって得られた画分1を酢酸エチルで分配し得られた画分8～14の花成誘導活性が調べられた。その結果(Fig. 1-7), 花成誘導活性は水相画分である画分8に局在した。

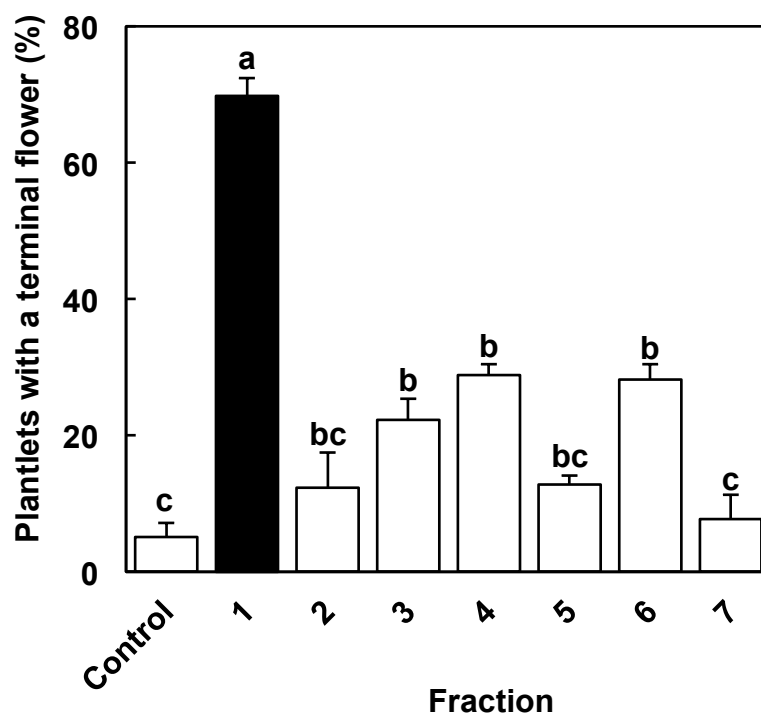


Fig. 1-6 Flower-inducing activities of fractions separated by CHCl_3 participation.

The diffusate fraction (dialyzed with a dialysis membrane MWCO 1,000) was fractionated by CHCl_3 participation. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

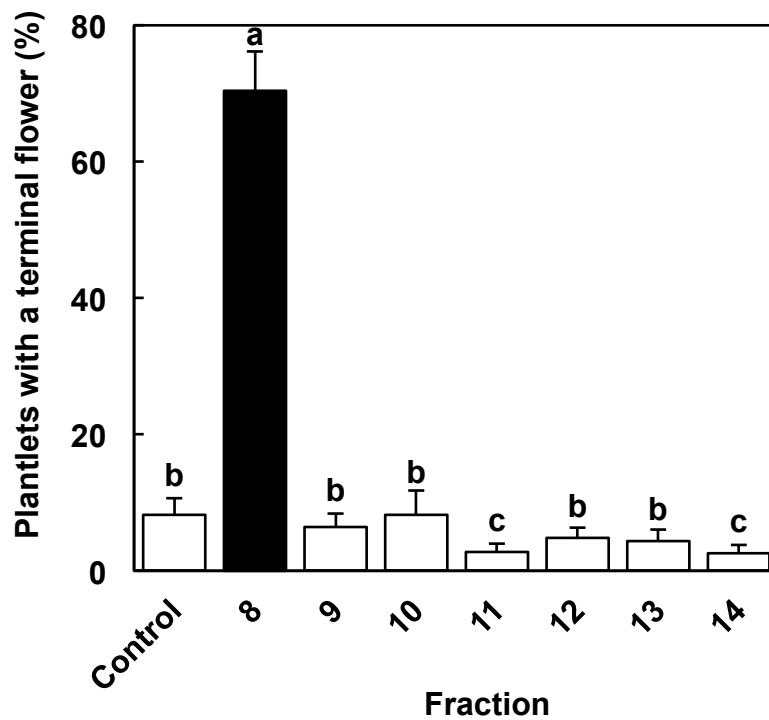


Fig. 1-7 Flower-inducing activities of fractions separated by ethyl acetate participation.

The active phase for CHCl_3 participation (Fraction 1) was fractionated by ethyl acetate participation. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

5 短日篩管液低分子画分のイオン交換樹脂による分画

溶媒分配で得られた画分8をイオン交換樹脂によって分画した。まず、陰イオン交換樹脂(DEAE Sephacel)によって分画し、花成誘導活性を調べた。その結果(Fig. 1-8), 花成誘導活性は陰イオン交換樹脂に吸着しない画分(Flow through画分)に局

在した。次に陰イオン交換樹脂による分画で活性があったFlow through画分を陽イオン交換樹脂(CM Cellulose)によって分画した。その結果(Fig. 1-9), 花成誘導活性は陽イオン交換樹脂からの溶出画分に局在し, 最も高い活性は画分4~6で得られた。

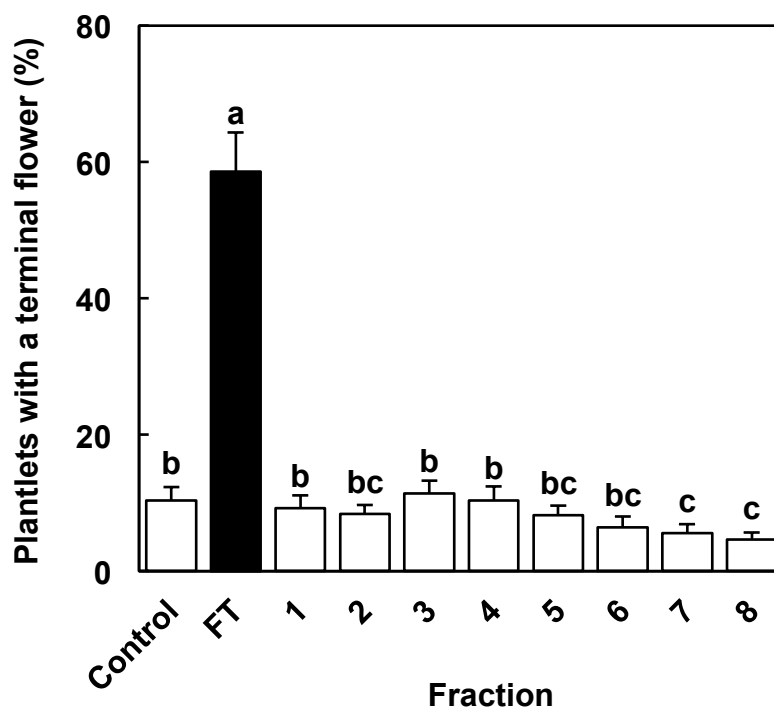


Fig. 1-8 Flower-inducing activities of fractions separated by anion exchange column.

The fraction with flower-inducing activity after solvent participation (Fraction 8) was applied to anion exchange column. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

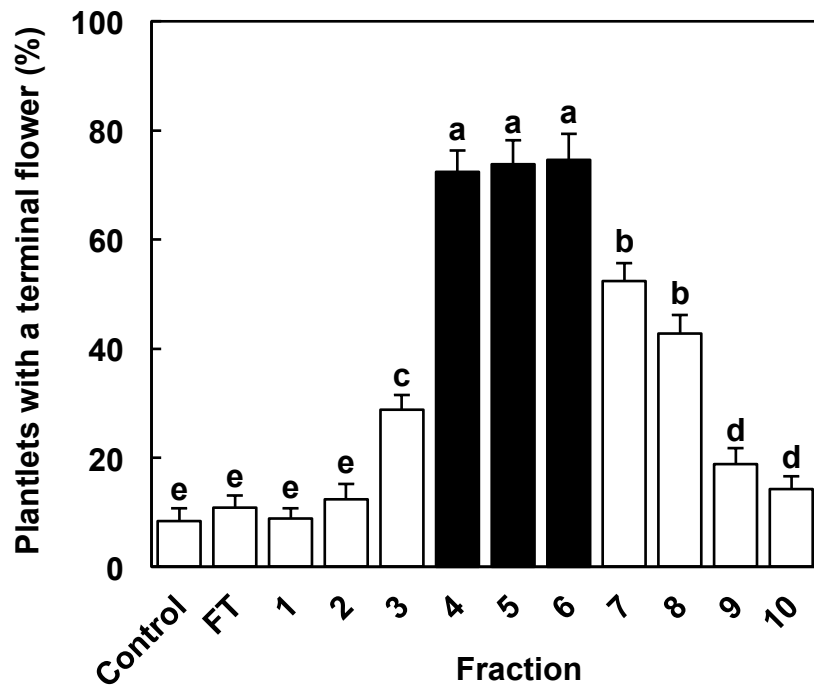


Fig. 1-9 Flower-inducing activities of fractions separated by cation exchange column.

The fraction with flower-inducing activity after anion exchange chromatography (Flow through fraction) was applied to cation exchange column. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

6 短日篩管液低分子画分のSep-Pak C18 cartridgeによる分画

陽イオン交換樹脂(CM Cellulose)による分画で花成誘導活性があった画分(画分4~6)をSep-Pak C18 cartridgeに添加し, 0, 10, 20, 25, 30, 50, 75, 100%のメタノールで順次溶出した。Fig. 1-10に示すように, 20%と25%メタノールで溶出した画分で最も高い花成誘導活性が見られた。

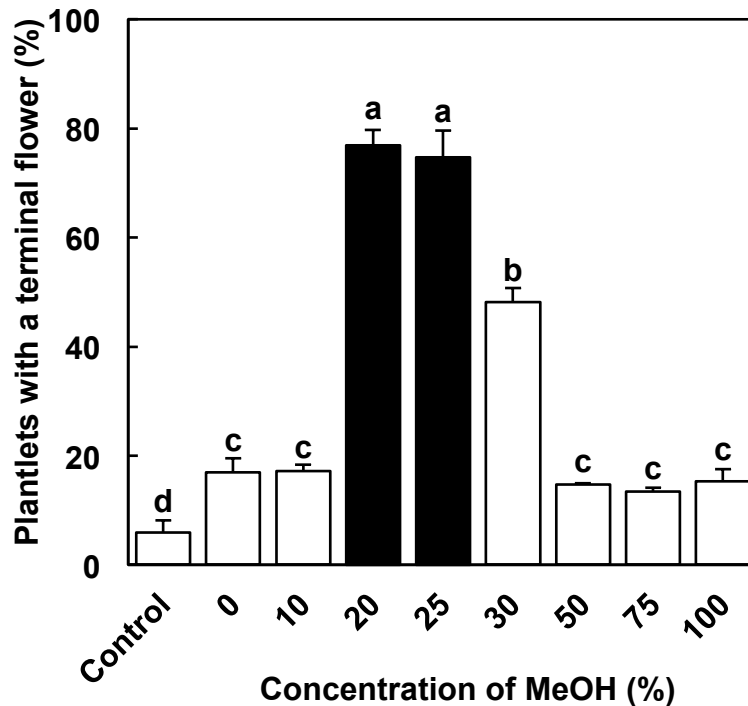


Fig. 1-10 Flower-inducing activities of fractions separated by Sep-Pak C18.

The fractions with flower-inducing activities after cation exchange chromatography (Fraction 4 to 6) were applied to Sep-Pak C18 cartridge. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

7 短日篩管液低分子画分の花成誘導活性と濃度の相関

これまでの短日篩管液低分子画分の部分精製の結果、花成誘導活性がどのくらい増加したか確認するために、はじめの透析で得られた透析外液画分(低分子画分)と短日篩管液の部分精製後のSep-Pak C18 cartridgeによる分画の活性画分(20%と25%メタノール溶出画分)をFig. 1-11に示したような濃度で培地に添加し、花成誘導活性と濃度との相関を調べた。低分子画分を10 μ gから100 μ g凍結乾燥重/mL培地に添加したとき花芽が誘導され、30 μ g凍結乾燥重/mL添加した時に最も高い花芽形

成率だった。また、部分精製した短日篩管液は培地に3 μg もしくは10 μg 凍結乾燥重/mL添加したとき最も高い花成誘導活性が見られ、低分子画分を30 μg 凍結乾燥重/mL添加したときと同じ程度の活性であった。

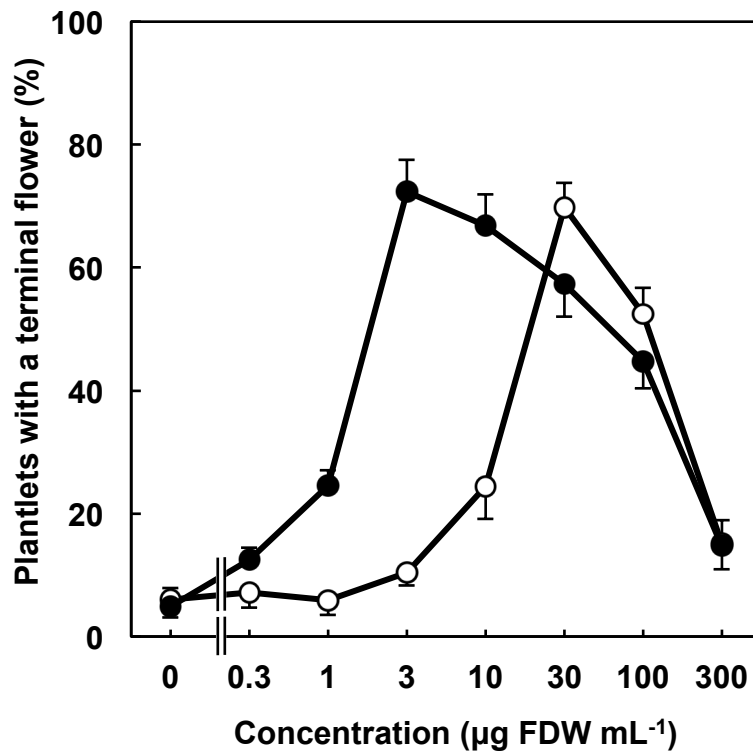


Fig. 1-11 Correlation between flower-inducing activity and concentration of phloem exudate.

Various concentrations of the diffusate fraction (○) and final 20 and 25% MeOH-eluted fractions from Sep-Pak C18 cartridge (●) were also added to assay medium. FDW means freeze-dry weight. Means \pm SE, $n = 13$.

第5節 考察

短日植物においては、短日刺激を受けた子葉及び葉で花成誘導物質が生成され、篩管を經由して茎頂に移動し、花芽を誘導すると考えられている(Imamura, 1967). ニホンアサガオst. Violetにおいて、短日処理した実生の子葉から採取した篩管液を茎頂培養の培地に添加すると花成を誘導することが報告され、短日処理した子葉から採取した篩管液中には花成誘導物質が含まれていることが証明された(Ishioka et al., 1990; Ishioka et al., 1991; Kondoh et al., 1999). この篩管液はニホンアサガオと種の異なるセイヨウアサガオ(*I. tricolor*) st. Heavenly Blueの花芽形成を誘導し、またセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの短日処理子葉から採取した篩管液はニホンアサガオst. Violetの花芽形成を誘導した(宮城, 2012). この篩管液中の花成誘導物質がChailakhyan(1937)によって提唱された全ての植物に共通な花成誘導物質であるフロリゲンと考えることは難しいが、少なくともニホンアサガオとセイヨウアサガオという両種間で共通して花成を引き起こす物質が含まれていると考えられる.

本研究では、セイヨウアサガオst. Heavenly Blueを用いて、16時間の誘導暗期を1回与えた実生の子葉から採取した篩管液、すなわち短日篩管液の花成誘導物質について検討した.

短日篩管液を透析によって分画した結果、分子量1,000以下の低分子画分と分子量10,000以上の高分子画分に花成誘導活性が検出された(Fig. 1-4). このことから、短日篩管液中には分子量1,000以下の低分子物質と分子量10,000以上の高分子物質の少なくとも2つの花成誘導物質が含まれていることになる. ニホンアサガオでも、クロロホルムと酢酸エチルを用いた溶媒分配で得られた水相画分を排除分子量10,000の透析膜で透析したとき、花成誘導活性は透析外液に局在し、短日篩管液中の花成誘導物質は低分子物質であると報告されている(Kondoh et al., 1999). しかしながら、Kondohらは透析内液及び外液を培地に添加後オートクレーブ滅菌しており、特に透析内液については、高分子量の活性物質が熱変性(分解)された可能性がある. 実際に、同様にして得られた透析内液をフィルター滅菌して培地に添加すると高

い花成誘導活性が認められた(宮城, 2012). 今回, セイヨウアサガオst. Heavenly Blue子葉からの短日篩管液の高分子画分にも花成誘導活性が検出された. この高分子物質の特性については第3章で詳述するが, この高分子物質はタンパク質の特性を示していた. すなわち, 短日篩管液中の高分子物質はFT相同タンパク質である可能性が高い.

本章では, 短日篩管液中の低分子物質の部分精製について述べる. 低分子画分の花成誘導活性の熱安定性を調べた結果, 熱処理によって低分子画分の花成誘導活性に変化はなく(Fig. 1-5), 低分子花成誘導物質は熱に安定な物質であると考えられた. また, ニホンアサガオst. Violetにおける研究でも花成誘導物質は熱に安定であった(Ishioka et al., 1990). Fig. 1-6とFig. 1-7で示したように, 低分子画分をクロロホルム及び酢酸エチルで分配すると, ほとんどの花成誘導活性は水相画分に検出されたので低分子画分中の花成誘導物質は極性が高い物質であると考えられる. 溶媒分配で得られた水相画分をイオン交換樹脂によって分画した結果, 陰イオン交換樹脂(DEAE Sephacel)に吸着しない画分に活性が局在し(Fig. 1-8), 陽イオン交換樹脂(CM Cellulose)に吸着する画分に活性が検出された(Fig. 1-9). 従って, 低分子画分中の花成誘導物質は酸性物質であると思われる. 陽イオン交換樹脂による分画で活性があった画分をさらにSep-Pak C18 cartridgeで分画したとき, 20%と25%メタノールで溶出した画分で最も高い花成誘導活性が見られた. 以上の精製作業から, 低分子画分の花成誘導物質は熱に安定で, 極性が高く酸性の物質であると考えられる. また, ニホンアサガオst. Violetにおいても花成誘導物質は低分子で熱に安定で極性の高い酸性の物質であると報告されている(Kondoh et al., 1999). 花成誘導物質は両方の種で同じような性質であり, また短日処理をした子葉から採取した短日篩管液はお互いの花成を引き起こす物質を含んでいる(宮城, 2012). このことから, 両方の種における花成誘導物質は構造的にも類縁な物質である可能性が高い. これまでの部分精製の結果, 活性がどの程度増加したか確認するため濃度と花成誘導活性の相関を調べた. その結果(Fig. 1-10), 精製前の低分子画分を10 μg 凍結乾燥重/mL添加すると花成が誘導され, 30 μg 凍結乾燥重/mL添加した時に最も高い花芽形成

率が得られた。100 µg凍結乾燥重/mL添加では花成は誘導されるが花成誘導活性はむしろ低下し、300 µg凍結乾燥重/mLの添加では花成誘導活性は検出されなかった。部分精製した低分子画分は0.3 µg凍結乾燥重/mLの添加で花成が誘導され、3 µgまたは10 µg凍結乾燥重/mL添加したとき最も高い花成誘導活性が見られた。それ以上の濃度の添加で活性は低下し、300 µg凍結乾燥重/mLの添加で花成誘導活性は検出されなかった。精製前の低分子画分を30 µg凍結乾燥重/mL添加した時の活性と部分精製した低分子画分を3 µgと10 µg凍結乾燥重/mL添加した時の活性は同じ程度の活性であった。従って、上記の精製作業によって花成誘導活性は約3倍から10倍増加したと考えられる。また、精製前の低分子画分または部分精製した低分子画分を高濃度添加することで花成誘導活性が低下した。この点については高濃度の添加によって小植物体の成長が阻害されたことにもとづく花成反応への悪影響も考えられるが、我々の検定系において小植物体の高さは通常3 cm以上である。故にもし高さが3 cm以下であったならば花成誘導の抑制は成長阻害によるものと判断される。しかしながら、今回のすべての実験において小植物体の高さは3 cm以上であった。そのため、篩管液の高濃度の添加による花成誘導活性の低下は成長阻害によって花成誘導が抑制されたものではないと考えられる。

これまでの部分精製の結果、セイヨウアサガオ st. Heavenly Blue における低分子の花成誘導物質は熱に安定で、極性が高い酸性物質であると考えられる。今後、この物質を単離・同定し、高分子の花成誘導物質さらには花成阻害物質との関係を明らかにすることで花成の制御メカニズムを解明する必要がある。

引用文献

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science** 309: 1052-1056.
- Bernier, G., Kinet, J. M., Sachs, R. M. (1981) The Physiology of Flowering. Vol. II. **Boca Raton CRC Press, Florida**
- Bonner, J., Bonner, D. (1948) None on induction of flowering in *Xanthium*. **Bot. Gaz.** 110: 154-156.
- Chailakhyan, M. Kh. (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. **C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS.** 16: 227-230.
- Corbesier, L., Coupland, G. (2005) Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: Integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. **Plant Cell Environ.** 28: 54-66.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountia, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science** 316: 1030-1033.
- Fujioka, S., Sakurai, A. (1992) Effect of L-pipecolic acid on flowering in *Lemna paucicostata* and *Lemna gibba*. **Plant Cell Physiol.** 33: 419-426.

- Fujioka, S., Sakurai, A. (1997) Conversion of lysine to L-pipecolic acid induces flowering in *Lemna paucicostata* 151. **Plant Cell Physiol.** 38: 1278-1280.
- Fujioka, S., Sakurai, A., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., Takimoto, A. (1987) Isolation and identification of L-pipecolic acid and nicotinamide as flower-inducing substances in *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 28: 995-1003.
- Fujioka, S., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., Takimoto, A., Cleland, C. F. (1986) Isolation and identification of nicotinic acid as a flower-inducing factor in *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 27: 103-108.
- Hamner, K., Bonner, J. (1938) Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. **Bot. Gaz.** 100: 388-431.
- Harada, H. (1967) Flower induction in excised shoot apices of *Pharbitis* and *Chrysanthemum* cultured *in vitro*. **Nature** 214: 1027-1028.
- Hatori, M., Sakagami, Y., Marumo, S. (1990) The effects of auxin and anti-auxin in an *in vitro* bioassay of flower regulatory activity in leaf exudates from tobacco plants. **Physiol. Plant.** 80: 130-135.
- Hayama, R., Agashe, B., Luley, E., King, R., Coupland, G. (2007) A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the

short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. **Plant Cell** 19: 2988-3000.

Hodson, H. K., Hamner, K. C. (1970) Floral inducing extract from *Xanthium*. **Science** 167: 384-385.

Imaizumi, T., Kay, S. A. (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. **Trends Plant Sci.** 11: 550-558.

Imamura, S. (1967) Photoperiodic induction and floral stimulus. In: "**Physiology of flowering *Pharbitis nil***" (ed. by Imamura, S.), Japanese society of Plant Physiologists, Tokyo, p 15-28.

Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1990) Flower-inducing activity of phloem exudate in cultured apices from *Pharbitis* seedlings. **Plant Cell Physiol.** 31: 705-709.

Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1991) Flower-inducing activity of phloem exudates from *Pharbitis* cotyledons exposed to various photoperiods. **Plant Cell Physiol.** 32: 921-924.

King, R. W., Zeevaart, J. A. D. (1974) Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. **Plant Physiol.** 53: 96-103.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science** 286: 1960-1962.

- Kondoh, M., Murakami, A., Shigeta, C., Tanimoto, S. (1999) Flower-inducing and -inhibiting activities of phloem exudate from cotyledons of *Pharbitis* seedlings. **Plant Growth Regul.** 28: 107-116.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvares, J. P., Esched, Y. (2006) The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103: 6398-6403.
- Lin, M. K., Belanger, H., Lee, Y. J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K. I., Miura, E., Xoconstle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R. A., Phinney, B., Lough, T. J., Lucas, W. J. (2007) FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. **Plant Cell** 19: 1488-1506.
- Lincoln, R. G., Cunningham, A., Hamner, K. C. (1964) Evidence for florigenic acid. **Nature** 202: 559-561.
- Lincoln, R. G., Mayfield, D. L., Cunningham, A. (1961) Preparation of a floral initiating extract from *Xanthium*. **Science** 133: 756.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., Schmid, M. (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. **Curr. Biol.** 17: 1055-1060.

- Mayfield, D. L., Lincoln, R. G., Hutchins, R. O., Cunningham, A. (1963) Concentration of a floral-inducing entity from plant extracts. **Agr. Food Chem.** 11: 35-38.
- 宮城麻衣 (2012) アサガオの花成誘導物質に関する研究. 修士論文 (佐賀大学)
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., Araki, T. (2008) Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. **Plant Cell Physiol.** 49: 1645-1658.
- Purse, J. G. (1984) Phloem exudate of *Perilla cirspa* and its effects of flowering of *P. cirspa* shoot explants. **J. Exp. Bot.** 35: 227-238.
- Searle, L., Coupland, G. (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. **EMBO J.** 23: 1217-1222.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., Shimamoto, K. (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. **Science** 316: 1033-1036.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. **Science** 309: 1056-1059.

第2章 低分子花成阻害物質

第1節 摘要

連続照明下で育てたセイヨウアサガオ(*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blueの実生の子葉から採取した篩管液(長日篩管液)の花成阻害活性を調べた。長日篩管液は、16時間の暗期を1回与え花成を誘導した実生から切り取って培養した茎頂の花成を阻害した。長日篩管液を透析し、分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000以上10,000以下の中分子画分、分子量10,000以上の高分子画分の3画分に分けて検定したとき、低分子画分にのみ花成阻害活性があり、中分子画分と高分子画分には花成阻害活性は存在しなかった。低分子画分をさらに分画し、花成阻害物質の特性を調べた。その物質は熱に安定であった。低分子画分を溶媒分配、イオン交換クロマトグラフィー、Sep-Pak C18 cartridgeによって分画した。その結果、花成阻害物質は低分子で極性が高く塩基性の物質であり、精製作業により花成阻害活性は約10倍増加した。

第2節 緒言

花成の制御は農業において非常に有用であり、多くの研究が行われている。GarnerとAllard (1925)は、コスモス(*Cosmos* sp.)を用いて日長が葉で感受されていることを最初に示した。また、*Xanthium pennsylvanicum* (Hamner and Bonner, 1938)やアカザ(*Chenopodium rubrum*) (King, 1972)を用いた実験では、葉を全て切り取った植物体を短日処理しても花芽が形成されず、1枚の葉の存在により花芽が形成されると報告されている。シソ(*Perilla crispa*)において、短日処理をした葉を切り取り、非誘導植物体に接ぐことでその非誘導植物体に花芽ができると報告された(Zeevaart, 1958)。これらのことから光周性を感受している器官は葉であると考えられた。日長を感受する器官は葉であり、花は茎頂で形成されることから、Knott (1934)は葉で生成された何らかの物質が茎頂に運ばれ花芽を誘導すると推測した。この物質は1937年にフロリゲンと命名された(Chailakhyan, 1937)。ニホンアサガオ(*Pharbitis nil*) st. Violetにおいて短日条件下で育てた実生の子葉から採取した篩管液は非誘導植物体の実生から切り取った培養茎頂に対して花成誘導活性があり、この活性物質のいくつかの特性が明らかにされた(Ishioka et al., 1990, 1991)。さらに、溶媒分配、透析、イオン交換クロマトグラフィー、Sep-Pak C18 cartridgeによって分画されたニホンアサガオst. Violetの篩管液は精製前の粗篩管液の花成誘導活性と比べて約10~30倍精製された(Kondoh et al., 1999b)。

一方、非誘導葉による花成の阻害がカランコエ(*Kalanchoe blossfeldiana*) (Hander et al., 1949)、オナモミ(*Xanthium strumarium*) (Lincoln et al., 1956)、ドクムギ(*Lolium temulentum*) (Evans, 1960)、ニホンアサガオ(Imamura, 1961)、シソ(King and Zeevaart, 1973)のような多くの植物種において報告されている。シソ(King and Zeevaart, 1973)とオナモミ(Zeevaart et al., 1977)において花成阻害が見られるとき、誘導葉から茎頂に輸送される同化産物の量が著しく減少した。また、ニホンアサガオにおいて、片方の非誘導の子葉の面積を変えることにより、もう一方の誘導された子葉から茎頂へ輸送される同化産物の到達量の変化と花成阻害効果の関

連性が示された(Ogawa and King, 1990). これらのことから, 非誘導葉による花成阻害は非誘導葉が茎頂への同化産物の主な供給源となるため, 誘導葉から茎頂への同化産物の輸送が抑制され, その結果として, 花成誘導物質の茎頂への輸送が少なくなるためであると解釈された. しかしながら, 花成阻害物質が非誘導葉で実際に生産されていることを示唆する多くの報告がある. オナモミとカラコエを用いて, PapafotiouとSchwabe (1990)は非誘導葉の光合成を阻害しても花成阻害効果は減少しないこと, また, 誘導葉の光合成量は花成誘導に影響がないことを明らかにした. これらの結果から, 彼らは, 花成の阻害は非誘導葉で生成された花成阻害物質によって起こると結論づけている. 短日性のイチゴ(*Fragaria ananassa*)を用いた実験では, 長日条件下で花成阻害物質が葉で作られ, ストロンを通過して移動し, そして成長領域で作用することが示されている(Guttridge, 1959; Vince-Prue and Guttridge, 1973).

接木もしくは非誘導の子葉や葉の抽出物による花成阻害もまた十分に立証されている(Jacobs, 1980). ニホンアサガオst. Violetにおいて連続照明下で育てられた実生の子葉から採取した篩管液は短日条件下で培養され花成を誘導された植物体から切り取った培養茎頂において花成阻害活性があった(Ishioka et al., 1990). 連続照明下で育てられたニホンアサガオst. Violetの子葉から採取した篩管液を種の異なるセイヨウアサガオst. Heavenly Blueに与えて花成阻害効果の共通性が調べられた. その結果, 連続照明下で育てられたニホンアサガオst. Violetから採取した篩管液は種の異なるセイヨウアサガオst. Heavenly Blueにおいて花成を阻害し, 同様に連続照明下で育てられたセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの子葉から採取した篩管液もまたニホンアサガオst. Violetの花成を阻害した(宮城, 2012). これらの結果から, 連続照明下で育てられた子葉から採取した篩管液中には種を超えて共通の花成阻害を引き起こす物質が含まれているのではないかと推測された. さらにニホンアサガオst. Violetにおいて, 花成は花成誘導物質と花成阻害物質の量的なバランスによって制御されていることが報告されており(Kondoh et al., 1999a), 花成阻害物質を明らかにすることは花成機構を解明する上で非常に重要である.

本章ではセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの連続照明下で育てられた実生の子葉から採取した篩管液中の花成阻害物質の分画を行い, その諸特性を調べた.

第3節 材料と方法

1 植物材料

材料として短日植物であるセイヨウアサガオ(*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blueを用いた。種子はタキイ種苗(Kyoto, Japan)から購入した。

2 検定方法(Fig. 2-1)

セイヨウアサガオst. Heavenly Blueの茎頂培養を検定系に用いた。種子を第1章と同様に処理して3%ショ糖, 0.3% Gelrite (Merck, USA)を添加したMS培地に無菌的に播種し, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で6日間栽培し, それらに16時間の誘導暗期を1回与えて花成を誘導した。検定のための茎頂はそれらの実生から採取した。採取した茎頂は5%ショ糖, 0.3% Gelriteを添加した10 mLのMS培地に置床した。茎頂培養は, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で行い, 培養4週間後に茎頂から発達した小植物体の頂花を計測し, 頂花形成率として表した。実験は1設定区につき13本以上の培養管で行い, 3回繰り返した。全ての実験データはLSD検定を用いてANOVAにより分析し, Tukeyの検定により比較した。

3 篩管液の採取方法(Fig. 2-2)

種子を第1章で示したのと同様の方法で処理し, バーミキュライトに播種した。それらを $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 連続照明下($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で7日間栽培した。その後, 実生の子葉から第1章で示した方法で篩管液を採取した。得られた篩管液を長日篩管液として以下の実験に用いた。

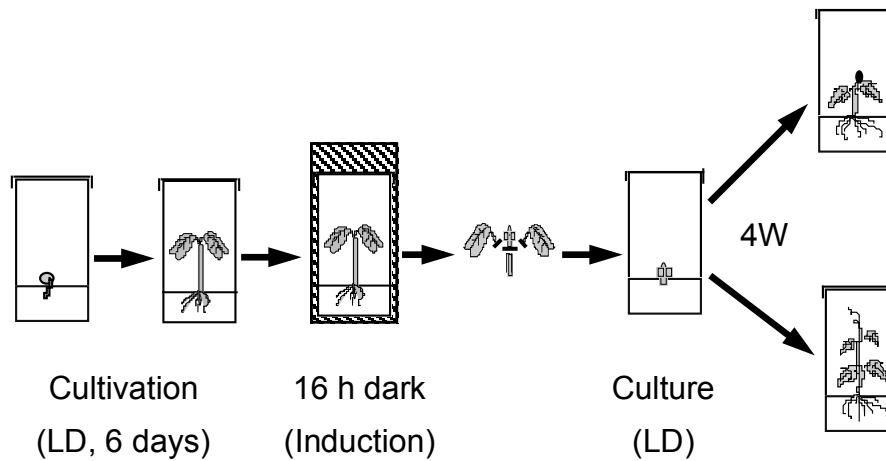


Fig. 2-1 Schematic diagram of apex culture.

Seeds of *Ipomoea tricolor* st. Heavenly Blue were sterilized with a solution of NaOCl, and then sown on MS medium supplemented 3% sucrose and 0.3% Gelrite. They were placed in an incubation room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After 6 days, these seedlings were exposed to a single 16 h dark period to induce flowering. Each apex was excised and cultured on 10 mL of MS medium with 5% sucrose, 0.3% Gelrite and PE or fraction of PE. Apex cultures were maintained under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The developed plantlets were examined for floral bud formation after 4 weeks, and the flowering response was expressed as the percentage of plantlets with a terminal flower.

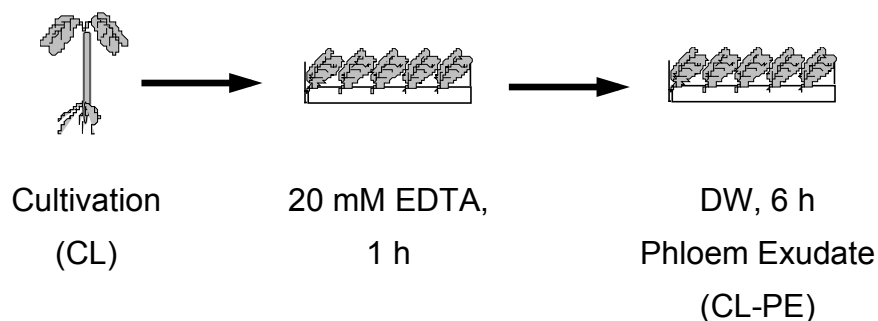


Fig. 2-2 Schematic diagram of phloem exudate collection.

Seeds of *I. tricolor* st. Heavenly Blue were sown on wet vermiculite and had been cultivated under continuous light conditions ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 7 days. For collection of phloem exudate, cotyledons were excised from the seedlings and placed into vials containing 20 mM EDTA. After incubation with EDTA solution for 1 h, the cotyledons were transferred to distilled water and incubated for 6 h. The exudate is referred to as phloem exudate.

4 長日篩管液の透析による分画

長日篩管液を凍結乾燥し、残渣を10 mLの蒸留水に溶解した。これを、排除分子量1,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 1,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1 Lの蒸留水に対して12時間4°Cで透析し、透析内液と透析外液に分けた。透析内液は凍結乾燥によって濃縮し、排除分子量10,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 10,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1

Lの蒸留水に対して12時間4°Cで再透析し、透析内液と透析外液に分けた。すべての透析内液と透析外液の画分は凍結乾燥し、残渣の重量(凍結乾燥重)を測定後、少量の蒸留水で溶解した。以上の透析により、分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000-10,000の中分子画分、分子量10,000以上の高分子画分に分画した。30 µg凍結乾燥重/mLの粗長日篩管液と10 µgもしくは30 µg凍結乾燥重/mLの得られた3画分の花成阻害活性を調べ、低分子画分をその後の実験に用いた。

5 長日篩管液の花成阻害活性における熱処理の影響

花成阻害活性の熱安定性を調べるために、長日篩管液の低分子画分を70°Cまたは100°Cで15分加熱し、フィルター滅菌後、オートクレーブ滅菌した培地に添加した。また、低分子画分を培地に添加した後、オートクレーブ滅菌することにより121°C、15分の熱処理とした。これらの花成阻害活性を調べた。

6 長日篩管液の溶媒分配による分画

長日篩管液中の花成阻害物質の極性を調べるために、長日篩管液の低分子画分をクロロホルムと酢酸エチルを用いた溶媒分配によって分画を行った。低分子画分を6規定の塩酸でpH 3に調整した後、等量のクロロホルムを添加してよく攪拌し、分液ロートを用いて水相とクロロホルム相に分画した。その水相に再びクロロホルムを添加し、さらに2回同様に分配して、水相とクロロホルム相を得た。次に得られた水相を6規定の水酸化カリウムで塩基性(pH 12)にした後、再び等量のクロロホルムで3回分配して、水相(画分1)とクロロホルム相(画分2)に分画した。最初のクロロホルム分配で得られたクロロホルム相は5%炭酸水素ナトリウム水溶液(pH 9)を加えて3回分配し、水相とクロロホルム相に分けた。さらに、水相を塩酸で酸性(pH 3)にした後、クロロホルムで3回分配して水相(画分3)とクロロホルム相(画分4)に分けた。もう一方のクロロホルム相は水酸化カリウムでアルカリ性(pH 12)にした後、炭酸水素ナトリウ

ムで3回分配し、水相とクロロホルム相(画分5)に分け、水相は塩酸で酸性(pH 3)にした後、クロロホルムで水相(画分6)とクロロホルム相(画分7)に分けた。このようにしてクロロホルムを用いた溶媒分配によって計7画分を得た。

クロロホルムでの分配により得られた花成阻害活性がある画分(画分1)はさらに酢酸エチルを用いた溶媒分配によって同じように分画し、計7画分(画分8~14)を得た。溶媒分配の際、クロロホルム画分及び酢酸エチル画分はエバポレーターにより減圧・乾固して、メタノールに溶解し、水相は濃縮した。溶媒分配によって最終的に得られたすべての画分は凍結乾燥し、凍結乾燥重を測定した。そして、それぞれの画分の花成阻害活性を調べた。溶解に用いたメタノールによって花成が阻害されることはなかった。

7 長日篩管液のイオン交換樹脂による分画

溶媒分配による分画で花成阻害活性があった画分(画分8)をイオン交換樹脂により分画した。まず、凍結乾燥した画分8を10 mM リン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、陽イオン交換樹脂カラム(CM Cellulose, 1.5 × 10 cm, 20 mL bed volume; Whatman, Kent, UK)に吸着させ、同じ緩衝液を用いた洗浄液をFlow through画分とした。吸着した画分は1 MのNaClを含む同じ緩衝液により溶出し、5 mLずつ集め、画分1~10を得た。得た画分をそれぞれ培地に添加して花成阻害活性を調べた。陽イオン交換樹脂に吸着しなかった画分(Flow through画分)はエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥し、10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に溶解し、陰イオン交換樹脂カラム(DEAE Sephacel™, 1.5 × 10 cm, 20 mL bed volume; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)に吸着させ、同じ緩衝液を用いた洗浄液をFlow through画分とした。そして、吸着した画分は1 MのNaClを含む同じ緩衝液により溶出し、5 mLずつ集め、画分1~10を得た。得た画分の花成阻害活性を調べた。10 mM リン酸緩衝液、10 mM Tris-HCl緩衝液及び溶出に用いたNaClによって花成が阻害されることはなかった。

8 長日篩管液のSep-Pak C18 cartridgeによる分画

陰イオン交換樹脂による分画で活性の得られた画分(画分4~5)をSep-Pak C18 cartridge (Waters, MA, USA)により分画した。画分4~5をエバポレーターにより減圧・乾固し、0.1%の酢酸を含む蒸留水に溶解後、Sep-Pak C18 cartridgeに添加し、0.1%の酢酸を含む0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100%のメタノール100 mLで順次溶出した。すべての画分はエバポレーターにより減圧・乾固し、蒸留水に溶解後、花成阻害活性を調べた。

9 長日篩管液の花成阻害活性と濃度の相関

これまでの精製作業により得られた画分の精製程度を確認するために、長日篩管液の濃度と花成阻害活性の相関について調べた。粗長日篩管液とSep-Pak C18 cartridgeによる分画で活性が得られた15%メタノール溶出画分をそれぞれ0, 1, 3, 10, 30, 100 μg 凍結乾燥重/mL培地に添加して花成誘導活性を調べた。

第4節 結果

1 長日篩管液の透析による分画

長日篩管液を排除分子量1,000の透析膜で透析し、その透析内液を凍結乾燥して濃縮後、排除分子量10,000の透析膜で再透析した。得られた分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000-10,000の中分子画分、分子量10,000以上の高分子画分の3画分の花成阻害活性を調べた。低分子画分では花成阻害活性は認められたが、中分子画分と高分子画分には花成阻害活性は存在しなかった(Fig. 2-3)。

2 長日篩管液の花成阻害活性における熱処理の影響

長日篩管液の低分子画分における花成阻害活性の熱安定性を調べるために、低分子画分を様々な温度で熱処理した。Fig. 2-4に示したように、熱処理によって花成阻害活性に変化はなく、オートクレーブによる熱処理(121°C, 15分)によっても活性は減少しなかった。

3 長日篩管液の溶媒分配による分画

長日篩管液の低分子画分をクロロホルム、次いで酢酸エチルを用いた分配によって分画し、それぞれの画分の花成阻害活性を調べた。低分子画分をクロロホルムでの溶媒分配によって画分1～7に分画し検定したところ、花成阻害活性は水層画分である画分1に局在した(Fig. 2-5)。続いて、画分1を酢酸エチル分配によって画分8～14に分画した。花成阻害活性は水層画分である画分8に局在した(Fig. 2-6)。

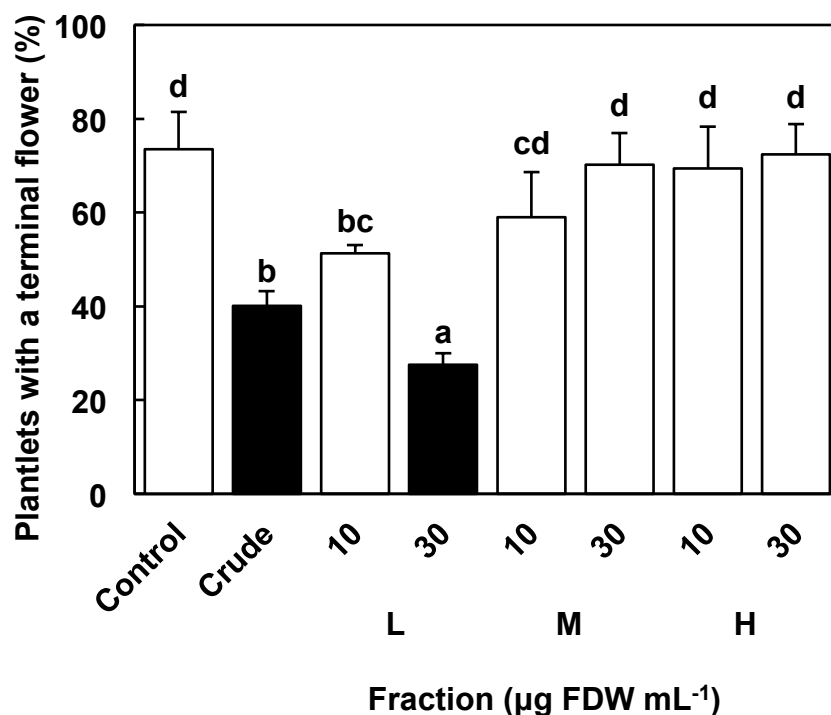


Fig. 2-3 Flower-inhibiting activities of fractions separated by dialysis.

The phloem exudate was collected from seedlings grown under continuous light conditions (CL-PE). Using 30 µg FDW mL⁻¹ of the crude CL-PE and 10 or 30 µg FDW mL⁻¹ of low (L), middle (M) and high (H) molecular weight fraction, flower-inhibiting activity was examined. Culture medium without CL-PE or fraction separated from CL-PE was used as a control. FDW means freeze-dry weight. Means ± SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

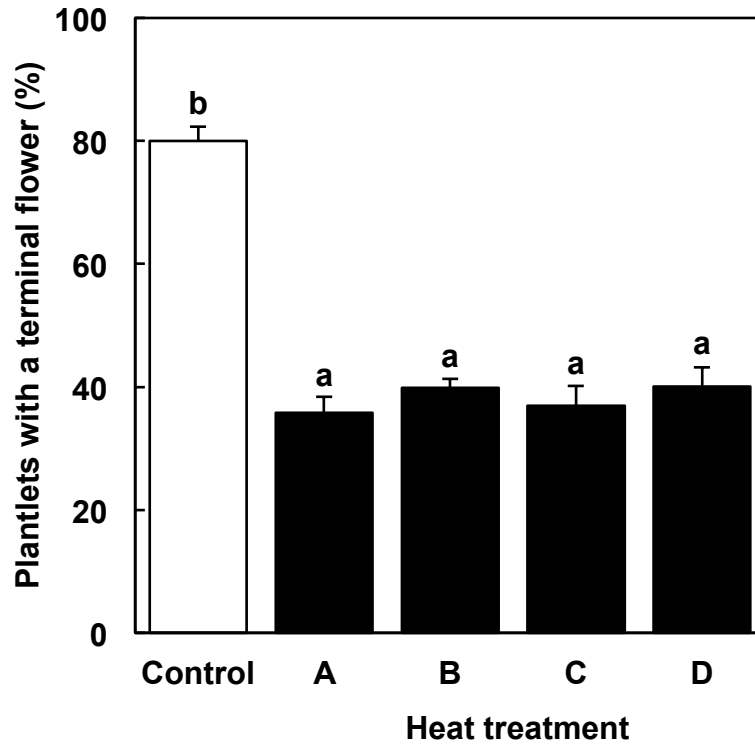


Fig. 2-4 Effect of heat treatment on the flower-inhibiting activity of phloem exudate (CL-PE).

The phloem exudate was collected from seedlings grown under continuous light conditions (CL-PE). The diffusate fraction from the first dialysis of the CL-PE was heated at 70°C (B), 100°C (C) or 121°C (autoclaving) (D). A; No heat treatment. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

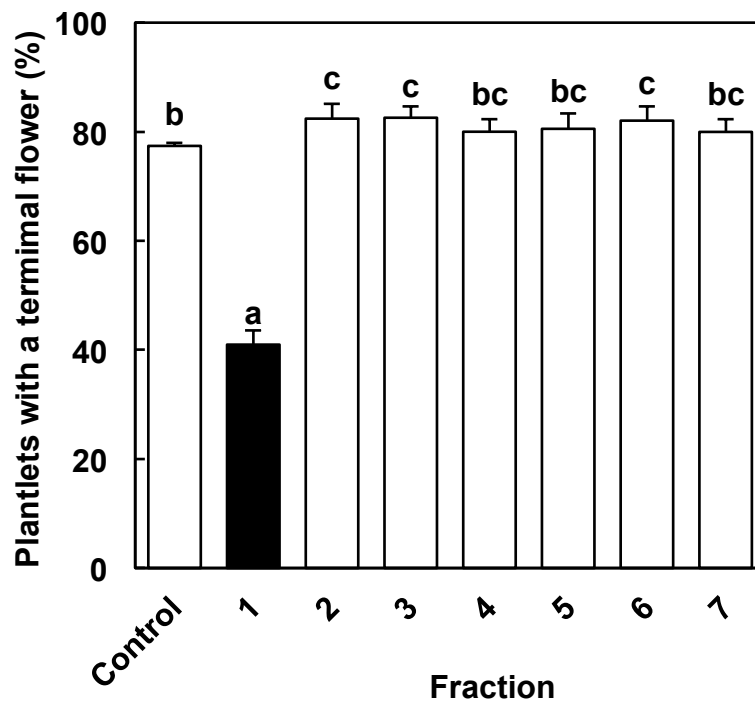


Fig. 2-5 Flower-inhibiting activities of fractions separated by CHCl_3 participation.

The diffusate fraction (dialyzed with a dialysis membrane MWCO 1,000) was fractionated by CHCl_3 participation. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

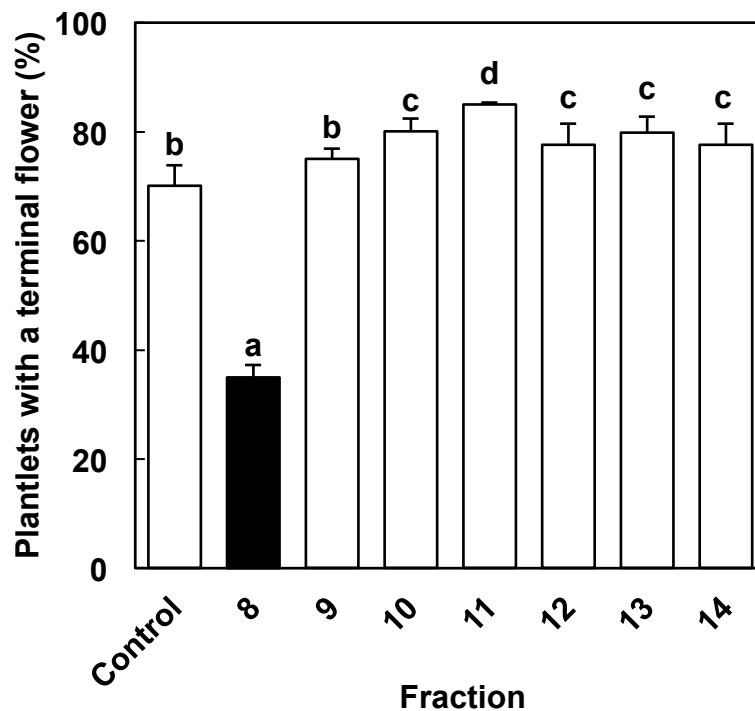


Fig.2-6 Flower-inhibiting activities of fractions separated by ethyl acetate participation.

The active phase for CHCl_3 participation (Fraction 1) was fractionated by ethyl acetate participation. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

4 長日篩管液のイオン交換樹脂による分画

酢酸エチルでの分配で活性があった画分8をさらにイオン交換クロマトグラフィーによって分画した。画分8を陽イオン交換樹脂(CM Cellulose)によって分画した結果、花成阻害活性は陽イオン交換樹脂に吸着しない画分(Flow through)画分に局在した(Fig. 2-7)。そのFlow through画分を続いて陰イオン交換樹脂(DEAE Sephacel)によ

って分画した. 花成阻害活性は陰イオン交換樹脂からの溶出画分に局在し, 最も高い活性は画分4~5で得られた(Fig. 2-8).

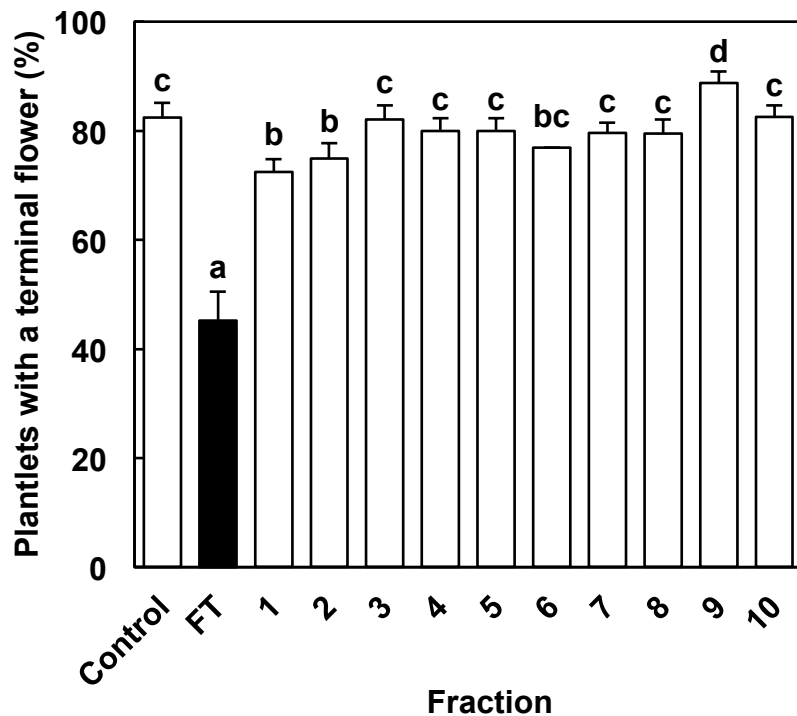


Fig. 2-7 Flower-inhibiting activities of fractions separated by cation exchange column.

The active phase of ethyl acetate participation (Fraction 8) was applied to cation exchange column. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

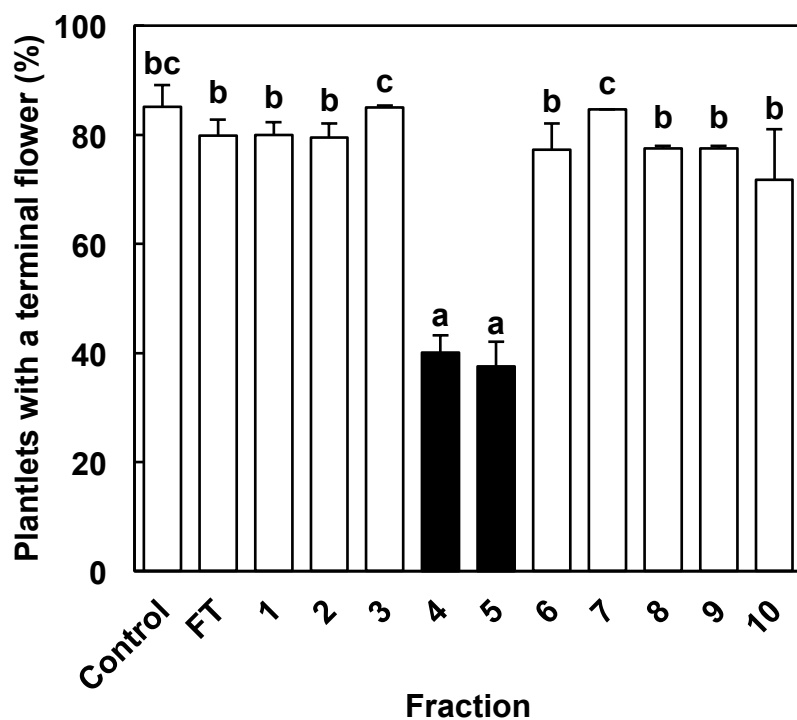


Fig. 2-8 Flower-inhibiting activities of fractions separated by anion exchange column.

The fraction with flower-inhibiting activity after cation exchange chromatography (Flow through fraction) was applied to anion exchange column. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

5 長日篩管液のSep-Pak C18 cartridgeによる分画

陰イオン交換樹脂(DEAE Sephacel)による分画で活性のあった画分(画分4~5)を Sep-Pak C18 cartridgeに添加し, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100%のメタノールで順次溶出した. Fig. 2-9に示すように, 15%メタノールで溶出した画分で花成阻害活性が見られた.

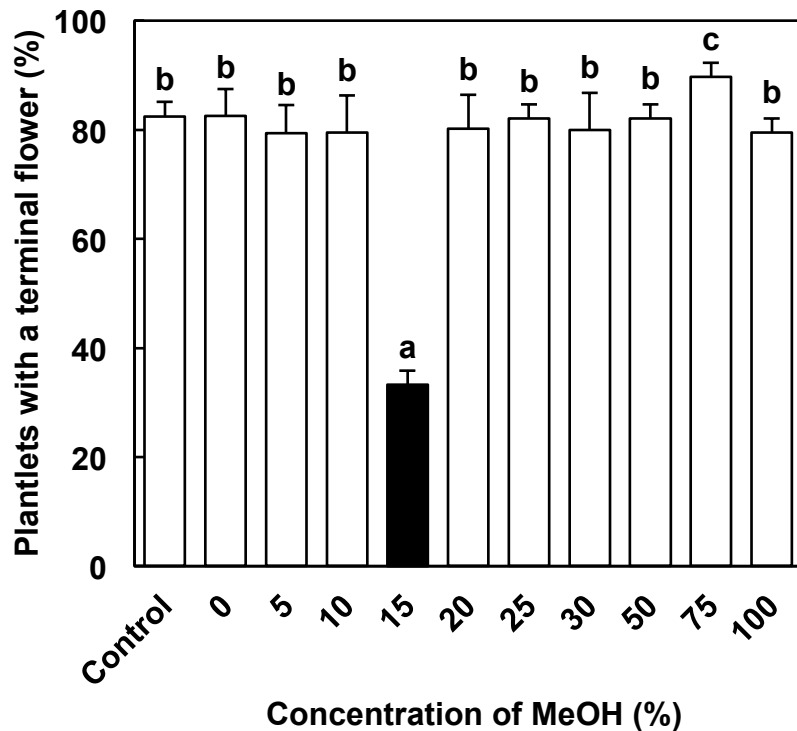


Fig. 2-9 Flower-inhibiting activities of fractions separated by Sep-Pak C18 cartridge.

The fractions with flower-inhibiting activities after anion exchange chromatography (Fraction 4 and 5) were applied to Sep-Pak C18 cartridge. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

6 長日篩管液の花成阻害活性と濃度の相関

これまでの部分精製によってどの程度花成阻害活性が増加したか確認するために、粗長日篩管液と長日篩管液の部分精製後のSep-Pak C18 cartridgeによる分画の活性画分(15%メタノール溶出画分)をFig.2-10に示したような濃度で培地に添加し、花成阻害活性と濃度との相関を調べた。粗長日篩管液を培地に添加した時、どの濃

度においても花成阻害活性は見られ, 最も高い花成阻害活性は30 μg 凍結乾燥重/mLのときであった. また, 部分精製した長日篩管液は培地に3 μg 凍結乾燥重/mL添加したとき最も高い花成阻害活性が見られ, 粗長日篩管液を30 μg 凍結乾燥重/mL添加したときと同じ程度の活性であった.

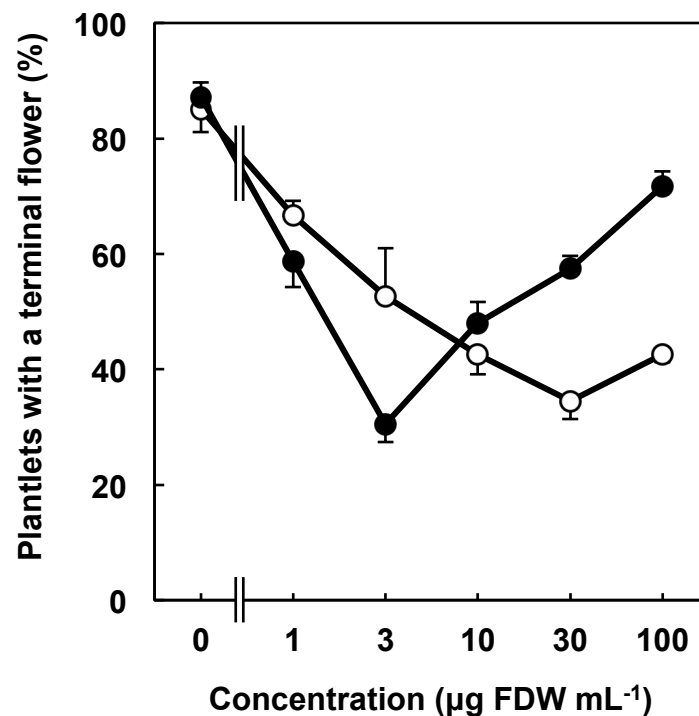


Fig. 2-10 Correlation between flower-inhibiting activity and concentration of phloem exudate (CL-PE).

The phloem exudate was collected from seedlings grown under continuous light conditions (CL-PE). Various concentrations of crude CL-PE (○) and final 15% MeOH-eluted fraction from Sep-Pac C18 cartridge (●) were added to assay medium. FDW means freeze-dry weight. Means \pm SE, n = 13.

第5節 考察

非誘導葉が花成を阻害することは多くの植物で知られている(Evans, 1960; Guttridge, 1959; Hander et al., 1949; King and Zeevaart, 1973; Lincoln et al., 1956; Imamura, 1961; Ogawa and King, 1979). ニホンアサガオst. Violetでは, 連続照明下で育てられた実生の子葉から採取した篩管液は誘導植物体から切り取った培養茎頂において花成阻害効果を示した(Ishoka et al., 1990). このことから, この篩管液には花成阻害物質が含まれていると考えられる. 本章では, 連続照明下で育てたセイヨウアサガオst. Heavenly Blue実生の子葉から採取した篩管液, すなわち長日篩管液の花成阻害活性について検討した.

長日篩管液を透析によって分画した結果, 低分子画分に花成阻害活性が検出された(Fig. 2-3). このことから, 花成阻害物質は分子量1,000以下の低分子物質であることが示唆された. ニホンアサガオでも連続照明下で育てた実生から採取した篩管液を排除分子量1,000の透析膜で透析したとき, 花成阻害活性は透析外液に局在し, 分子量1,000以下の物質であると報告されている(Kondoh et al., 1999b). 長日篩管液を熱処理して花成阻害活性の熱安定性を調べた(Fig. 2-4). 熱処理によって花成阻害活性に変化はなく, 長日篩管液に含まれる花成阻害物質は熱に安定な物質であると考えられる. Fig. 2-5とFig. 2-6で示したように, 長日篩管液をクロロホルム, 次いで酢酸エチルで分配すると, ほとんどの花成阻害活性は水相画分に検出されたので長日篩管液中の花成阻害物質は極性が高い物質であると考えられた. 溶媒分配で得られた花成阻害活性を有する画分をイオン交換樹脂によって分画した結果, 陽イオン交換樹脂(CM Cellulose)に吸着しない画分に活性があり(Fig. 2-7), 陰イオン交換樹脂に(DEAE Sephacel)に吸着する画分に活性が検出された(Fig. 2-8). 従って, 長日篩管液中の花成阻害物質は塩基性物質であることが示唆された. 陰イオン交換樹脂による分画で活性があった画分をさらにSep-Pak C18 cartridgeで分画したとき, 15%メタノールで溶出した画分で花成阻害活性が見られた. 以上の精製作業から長日篩管液の花成阻害物質は熱に安定で, 極性が高く塩基性の物質であると考え

られる。ニホンアサガオst. Violetにおいて花成阻害物質は低分子で熱に安定であり極性の高い中性の物質であると報告されている(Kondoh et al., 1999b)。花成阻害物質はニホンアサガオst Violet, セイヨウアサガオst. Heavenly Blue両方の種において似た性質であり, 連続照明下で育てられた実生の子葉から採取した篩管液はお互いの花成の阻害を引き起こす物質を含んでいると考えられる(宮城, 2012)。このことから, 両方の種における花成阻害物質は構造的にも類縁な物質であるかもしれない。

これまでの部分精製の結果, 活性がどの程度増加したか確認するため濃度と花成阻害活性の相関を調べた。その結果(Fig. 2-10), 粗長日篩管液を培地に添加した時, どの濃度においても花成阻害活性は見られ, 最も高い花成阻害活性は30 μg 凍結乾燥重/mLのときであった。それ以上の濃度の添加で活性は低下した。また, 部分精製した長日篩管液は培地に3 μg 凍結乾燥重/mL添加したとき最も高い花成阻害活性が見られ, それ以上の濃度の添加で活性は低下していった。部分精製した長日篩管液3 μg 凍結乾燥重/mLの添加は粗長日篩管液を30 μg 凍結乾燥重/mL添加したときと同じ程度の活性であった。従って, 上記の精製作業によって花成阻害活性は約10倍増加したと考えられる。

ニホンアサガオにおいて, 花成は花成誘導物質と花成阻害物質の量的なバランスによって制御されていると報告されており(Kondoh et al., 1999a), 花成阻害物質を明らかにすることは花成機構を解明する上で非常に重要である。これまでの部分精製の結果, セイヨウアサガオst. Heavenly Blueにおける長日篩管液中の花成阻害物質は熱に安定で, 極性が高い塩基性物質であると考えられる。今後, この物質の単離・同定を行う必要がある。

引用文献

- Chailakhyan, M. Kh. (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. **C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS.** 16: 227-230.
- Evans, L. T. (1960) Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. 2. Evidence for inhibitory and promotive photoperiodic process involving transmissible products. **Aust. J. Biol. Sci.** 13: 429-440.
- Garner, W. W., Allard, H. A. (1925) Localization of the response in plants to relative length of day and night. **J. Agr. Res.** 31: 555-566.
- Guttridge, C. G. (1959) Further evidence for growth-promoting and flower-inhibiting hormone in strawberry. **Ann. Bot.** 23: 612-621.
- Hamner, K., Bonner, J. (1938) Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. **Bot. Gaz.** 100: 388-431.
- Hander, R., Westphal, M., Behrens, G. (1949) Hemmung der Infloreszenzbildung durch Langtag bei der Kurstagspflanze *Kalanchoë blossfeldiana*. **Planta** 36: 424-438.
- Imamura, S. (1961) The nature of inhibition of flowering by the leaves illuminated continuously during the inductive dark treatment of other leaves in short-day. **Recent Adv. Bot.** 2: 1287-1288.

- Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1990) Flower-inducing activity of phloem exudate in cultured apices from *Pharbitis* seedlings. **Plant Cell Physiol.** 31: 705-709.
- Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1991) Flower-inducing activity of phloem exudates from *Pharbitis* cotyledons exposed to various photoperiods. **Plant Cell Physiol.** 32: 921-924.
- Jacobs, W. P. (1980) Inhibition of flowering in short-day plants. In: "**Plant Growth Substances 1979**" (ed. by Skoog, F.), Springer-Verlag, Berlin, p 301-309.
- King, R. W. (1972) Timing in *Chenopodium rubrum* of export of the floral stimulus from the cotyledons and its action at the shoot apex. **Can. J. Bot.** 50: 697-702.
- King, R. W., Zeevaart, J. A. D. (1973) Floral stimulus movement in *Perilla* and flower inhibition caused by noninduced leaves. **Plant Physiol.** 51: 727-738.
- Knott, J. H. (1934) Effects of localized photoperiod on spinach. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** 31: 152-154.
- Kondoh, M., Fukusada, Y., Murakami, A., Shigeta, C., Tanimoto, S. (1999a) Flowering may be controlled by a quantitative balance between flower-inducing and -inhibiting substances in *Pharbitis nil*. **Plant Growth Regul.** 28: 101-106.

- Kondoh, M., Murakami, A., Shigeta, C., Tanimoto, S. (1999b) Flower-inducing and -inhibiting activities of phloem exudate from cotyledons of *Pharbitis* seedlings. **Plant Growth Regul.** 28: 107-116.
- Lincoln, R. G., Raven, K. A., Hamner, K. C. (1956) Certain factors influencing expression of the flowering stimulus in *Xanthium*. Part I. Translocation and inhibition of the flowering stimulus. **Bot. Gaz.** 117: 193-206.
- 宮城麻衣 (2012) アサガオの花成誘導物質に関する研究. 修士論文 (佐賀大学)
- Ogawa, Y., King, R. W. (1979) Indirect action of benzyladenine and other chemicals on flowering of *Pharbitis nil* Chois. **Plant Physiol.** 63: 643-649.
- Ogawa, Y., King, R. W. (1990) The inhibition of flowering by non-induced cotyledons of *Pharbitis nil*. **Plant Cell Physiol.** 31: 129-135.
- Papafotiou, M., Schwabe, W. W. (1990) Studies on the long-day inhibition of flowering in *Xanthium* and *Kalanchoe*. **Physiol. Plant.** 80: 177-184.
- Vince-Prue, D., Guttridge, C. G. (1973) Floral initiation in strawberry: Spectral evidence for the regulation of flowering by long-day inhibition. **Planta** 110: 165-172.
- Zeevaart, J. A. D. (1958) Flower formation as studied by grafting. **Meded. Landbouwhogeschool Wageningen** 58: 1-88.

Zeevaart, J. A. D., Brede, J. M., Cetas, C. B. (1977) Translocation patterns in *Xanthium* in relation to long day inhibition of flowering. **Plant Physiol.** 60: 747-753.

第3章 高分子花成誘導物質

第1節 摘要

セイヨウアサガオ(*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blueを材料として、短日処理した子葉からの篩管液の花成誘導活性について調べた。16時間暗期を1回与えた実生の子葉から採取した篩管液(短日篩管液)は非誘導の実生から切り取った培養茎頂の花成を誘導した。短日篩管液を透析によって4画分に分けたとき、分子量1,000以下の低分子画分と分子量10,000-25,000の高分子画分には花成誘導活性があった。花成誘導活性があった高分子画分の化学的特性を明らかにするために、高分子画分を各種の高分子物質分解酵素で処理した。花成誘導活性はProteinase K処理によって消失した。従って、高分子活性物質はタンパク質であると考えられる。高分子画分をゲル濾過によって分画したとき、活性画分の推定分子量は約23,000 Daltonだった。短日篩管液低分子画分の同時添加は高分子画分の花成誘導活性に影響しなかった。連続照明下で育てたセイヨウアサガオの実生から採取した篩管液(長日篩管液)は花成を誘導した実生から切り取った培養茎頂の花成を阻害するが、検定培地にその長日篩管液と短日篩管液の高分子画分とを同時に添加したとき、花成は阻害された。

第2節 緒言

花成における制御機構の解明は農業や園芸において非常に重要である。短日植物において、植物からの抽出物中の花成誘導物質を検出しようとする多くの研究が行われてきた(Bonner and Bonner, 1948; Lincoln et al., 1964; Hodson and Hamner, 1970; Zeevaart, 1979; Fujioka et al., 1986)。Ishiokaら(1990, 1991)はニホンアサガオ(*Pharbitis nil*) st. Violetの実生を用いて、短日処理した子葉から採取した篩管液が非誘導の実生から切り取った培養茎頂において花成誘導活性を持つことを報告した。その花成誘導物質は低分子物質であった(Kondoh et al., 1999)。また、第1章でセイヨウアサガオ st. Heavenly Blueの短日処理した子葉から採取した篩管液の透析によって分画した分子量1,000以下の低分子画分が花成を誘導する物質を含んでいることを報告した。

一方で、高分子量の花成誘導物質の存在についても多くの報告がなされている。長日植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて *fy*, *fpa*, *fve*, *fca*, *fe*, *ft* 等のような多数の花成遅延突然変異体が作出された(Koornneef et al., 1991)。これらのうち、*FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子(FTタンパク質)については日長による花成制御経路において、*CONSTANS (CO)* 遺伝子の下流で働く強力な花成誘導因子として同定された(Kardailsky et al., 1999, Kobayashi et al., 1999)。光周刺激を感受する器官は葉及び子葉であり、花芽は茎頂で形成される。それはフロリゲンと呼ばれるシグナル物質が篩管を通過して茎頂へ移動するためであると考えられた(Chailakhyan, 1937)。長日植物のシロイヌナズナにおける多くの実験からFTタンパク質が機能する主要部位は茎頂であること、FTタンパク質が茎頂分裂組織付近でフロリゲンとして花成を誘導するために作用することが証明された(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005)。短日植物であるイネ(*Oryza sativa*)においても、*FT* 遺伝子のイネにおけるオーソログである *Heading date 3a (Hd3a)* 遺伝子が同定され、Hd3aタンパク質が葉から茎頂へ移動することが報告された(Tamaki et al., 2007; Mathieu et al., 2007)。同様にFT相同タンパク質が中性植物のトマト(*Solanum lycopersicon*)

(Lifschitz et al., 2006), 短日植物のニホンカボチャ(*Cucurbita moschata*)と中性植物のセイヨウカボチャ(*C. maxima*) (Lin et al., 2007), 短日植物のニホンアサガオst. Violet (Hayama et al., 2007) などで報告されている。FT遺伝子にGREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)遺伝子を結合させてシロイヌナズナに導入すると、茎頂でGFPの蛍光が認められた(Corbesier et al., 2007), 同様に, *Hd3a*遺伝子のプロモーターとGFP遺伝子を結合させて, イネに導入すると茎頂でGFPの蛍光が検出された(Tamaki et al., 2007), また, セイヨウカボチャの篩管液中にFT相同タンパク質のペプチド部分が検出された(Lin et al., 2007)といった報告がある。しかしながら, いずれの報告も間接的な証拠であって, より明確にFTタンパク質が篩管を經由して茎頂に到達していることを証明する必要がある。

第1章で, 短日処理をしたセイヨウアサガオst. Heavenly Blueの子葉から採取した短日篩管液には花成誘導活性が存在することを報告した。その短日篩管液を透析によって分子量1,000以下の低分子画分, 分子量1,000-10,000の中分子画分, 分子量10,000以上の高分子画分の3画分に分画したとき, 低分子画分と高分子画分の両方に花成誘導活性があった。低分子画分の花成誘導物質については第1章で検討した。篩管液中に低分子量と高分子量の花成誘導物質が存在しているならば, 両物質間の相関は花成メカニズムの解明において非常に重要である。本章では短日篩管液中の高分子画分の性質について検討した。また, 連続照明下で育てたセイヨウアサガオ(*I. tricolor*) st. Heavenly Blueの子葉から採取した長日篩管液には花成阻害活性がある(第2章)ので長日篩管液と短日篩管液の高分子画分の相関もまた調べた。

第3節 材料と方法

1 植物材料

材料として短日植物であるセイヨウアサガオ(*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blueを用いた。種子はタキイ種苗(Kyoto, Japan)から購入した。

2 検定方法(Fig. 3-1)

セイヨウアサガオst. Heavenly Blueの茎頂培養を検定系に用いた。種子を第1章と同様に処理して3%ショ糖, 0.3% Gelrite (Merck, USA)を添加したMS培地に無菌的に播種し, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で6日間栽培した。検定のための茎頂はそれらの実生から採取した。採取した茎頂は5%ショ糖, 0.3% Gelriteと篩管液の画分を添加したMS培地に置床した。なお, 篩管液画分の熱変成を避けるために, 篩管液画分以外の培地をオートクレーブ滅菌し, 培地の温度が下がってから, フィルター滅菌した篩管液画分を加えた。茎頂培養は $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で行い, 培養4週間後に茎頂から発達した小植物体の頂花を計測し, 頂花形成率として表した。実験は1設定区につき13本以上の培養管で行い, 3回繰り返した。全ての実験データはLSD検定を用いてANOVAにより分析し, Tukeyの検定により比較した。

3 篩管液の採取方法(Fig. 3-2)

種子を第1章で示した同様の方法で処理し, バーミキュライトに播種した。短日篩管液を採取する場合, それらを $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16時間明期($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 8時間暗期の培養室で6日間栽培し, その後16時間暗期を1回与えた。長日篩管液を採取する

場合、それらを $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、連続照明下($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で7日間栽培した。それぞれの実生の子葉から第1章で示した方法で篩管液を採取した。

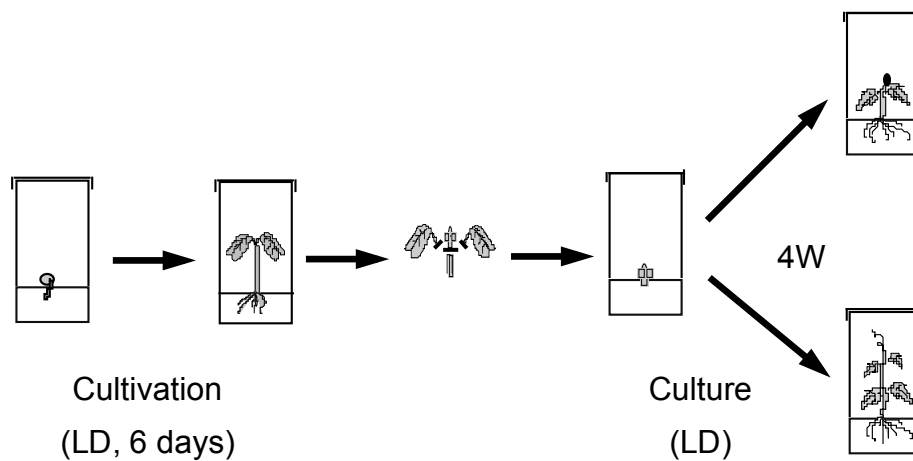


Fig. 3-1 Schematic diagram of apex culture.

Seeds of *Ipomoea tricolor* st. Heavenly Blue were sterilized with a solution of NaOCl, and then sown on MS medium supplemented 3% sucrose and 0.3% Gelrite. They were placed in an incubation room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 6 days. Each apex was excised and cultured on 10 mL of MS medium with 5% sucrose, 0.3% Gelrite. To examine effects of fraction of PE, culture medium was firstly autoclaved, the fraction of PE was filter-sterilized, and then added to the autoclaved medium. Apex cultures were maintained under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The developed plantlets were examined for floral bud formation after 4 weeks, and the flowering response was expressed as the percentage of plantlets with a terminal flower.

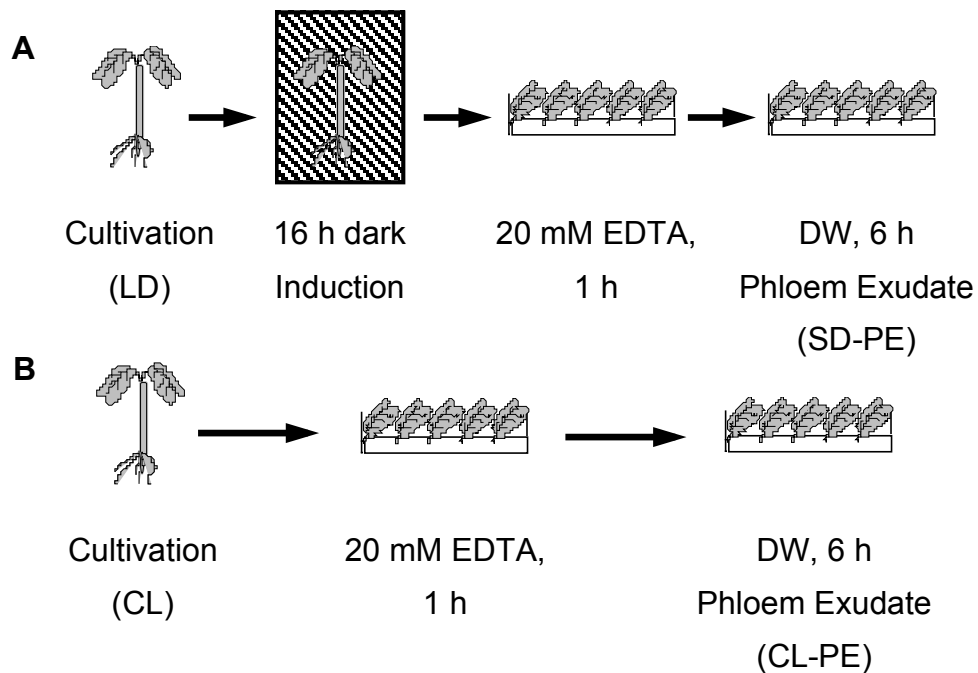


Fig. 3-2 Schematic diagram of phloem exudate collection.

Seeds of *I. tricolor* st. Heavenly Blue were sown on wet vermiculite.

A; In the case of SD-PE collection, they had been cultivated under 16 h photoperiod ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 6 days, and then the seedlings were exposed to a single 16 h dark period.

B; In the case of CL-PE collection, they had been cultivated under continuous light conditions ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at a constant temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 7 days.

For collection of phloem exudate, cotyledons were excised from the seedlings and placed into vials containing 20 mM EDTA. After incubation with EDTA solution for 1 h, the cotyledons were transferred to distilled water and incubated for 6 h.

4 短日篩管液の透析による分画

短日篩管液を凍結乾燥し、残渣を2 mLの蒸留水で溶解した。これを、排除分子量1,000の透析膜 (Spectra/Por 7 MWCO 1,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1 Lの蒸留水に対して透析し、透析内液と透析外液に分けた。両液は凍結乾燥し、凍結乾燥重を測定後、少量の蒸留水で溶解した。その透析内液を排除分子量10,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 10,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1 Lの蒸留水に対して透析し、透析内液と透析外液に分けた。両液は凍結乾燥し、残渣の重量(凍結乾燥重)を測定後、少量の蒸留水で溶解した。次に、その透析内液を排除分子量25,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 25,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い、1 Lの蒸留水に対して透析し、透析内液と透析外液に分けた。両液は凍結乾燥し、凍結乾燥重を測定後、少量の蒸留水で溶解した。以上の透析により、分子量1,000以下の低分子画分、分子量1,000-10,000の中分子画分、分子量10,000-25,000の高分子画分-1、分子量25,000以上の高分子画分-2に分画した。

5 短日篩管液の花成誘導活性と濃度の相関

短日篩管液の透析によって得た高分子画分-1(分子量10,000-25,000)の濃度と花成誘導活性の相関について調べた。高分子画分-1を凍結乾燥し、凍結乾燥重を測定後、0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg凍結乾燥重/mL培地に添加して花成誘導活性を調べた。

6 短日篩管液の花成誘導活性に及ぼす暗期の影響

短日篩管液中の高分子画分-1の花成誘導活性と処理した暗期との関係について調べるために8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 21, 22, 24時間の暗期処理した実生の子葉から篩管液を採取し、上記のように透析によって分画した。各篩管液を透析し、高分子画分-1(分子量10,000-25,000)の花成誘導活性を調べた。

7 短日篩管液の酵素処理

高分子物質分解酵素であるProteinase K (Boehringer Mannheim, Germany), DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), RNase A (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Hemicellulase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)とPectinase SE-150 (Shikibo-Lifetec, Japan)で短日篩管液の高分子画分-1を処理し, 花成誘導活性の変化について調べた.

Proteinase K, DNase I, RNase Aは10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し, それぞれ10 µg/mLの濃度で高分子画分-1に添加した. HemicellulaseとPectinase SE-150は50 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.3)に溶解し, それぞれ1ユニットを混合して高分子画分-1に添加した. DNase処理の場合のみ, 最終濃度5 mMの塩化マグネシウム溶液を加えた. 酵素反応は37°Cの恒温槽で2時間行った. 反応液を凍結乾燥後, 凍結乾燥重を測定し, 30 µg凍結乾燥重/mLの濃度で培地に添加して検定した. Proteinase K (分子量28,930 Dalton)処理の場合は, 処理後の溶液を排除分子量25,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 25,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用い, 1 Lの蒸留水に対して透析した. その透析外液を凍結乾燥し, 凍結乾燥重を測定後, 30 µg凍結乾燥重/mLの濃度で培地に添加して検定した. また, 酵素自体の花成に対する影響を調べるために, 酵素液のみを37°Cで2時間処理した溶液を, 酵素処理した場合と同じ濃度で培地に添加して対照とした.

8 短日篩管液のゲル濾過による分画

短日篩管液の高分子画分-1をゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した. Sephadex G-50 (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden)を150 mMのNaClを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化しカラム(1.5 × 30 cm, 50 mL bed volume)に充填した. 高分子画分-1を凍結乾燥し, 残渣を150 mMのNaClを含む50

mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で溶解し試料とした。溶出も同じ緩衝液で行い、流速1 mL/minで1.8 mLずつ集めた。それぞれの画分は、排除分子量1,000の透析膜(Spectra/Por 7 MWCO 1,000; Spectrum Laboratories, Houston, USA)を用いて脱塩し、凍結乾燥後、凍結乾燥重を測定し、30 µg凍結乾燥重/mLの濃度で培地に添加して検定した。排除容積(V_0)は0.2% Blue Dextran 2,000を用いて決定した。活性画分(画分16~18)の分子量は、cytochrome C (12,400 Dalton), α -lactalbumin (14,200 Dalton), β -lactoglobulin A (18,400 Dalton), trypsin inhibitor (20,000 Dalton), trypsinogen (24,000 Dalton)を用いて推定した。

9 短日篩管液の高分子画分の花成誘導活性に対する低分子画分の影響

第1章で述べたように、短日篩管液の低分子画分は花成誘導活性があった。その画分を溶媒分配、イオン交換クロマトグラフィー、Sep-Pak C18 cartridgeによって部分精製した。部分精製した活性画分を用いて、短日篩管液の高分子画分-1の花成誘導活性に対する影響について調べた。短日篩管液の低分子画分の部分精製した活性画分を0, 0.3, 1, 3, 10, 30 µg凍結乾燥重/mLの濃度で、高分子画分-1のゲル濾過による分画で花成誘導活性を有する画分(画分16~18; 30 µg凍結乾燥重/mL)と共に培地に添加して花成誘導活性を調べた。

10 短日篩管液の高分子画分の花成誘導活性に対する長日篩管液の影響

第2章で述べたように、長日篩管液の低分子画分には花成阻害活性があった。その画分を溶媒分配、イオン交換クロマトグラフィー、Sep-Pak C18 cartridgeによって部分精製した。短日篩管液の高分子画分-1の花成誘導活性における長日篩管液の影響を調べるために、ゲル濾過による分画で花成誘導活性を有する画分(画分16~18; 30 µg凍結乾燥重/mL)を0, 1, 3, 10, 30 µg凍結乾燥重/mLの長日篩管液の部分精製した低分子画分と共に培地に添加し、花成誘導活性を調べた。

第4節 結果

1 短日篩管液の透析による分画

短日篩管液を透析により, 分子量1,000以下の低分子画分, 分子量1,000-10,000の中分子画分, 分子量10,000-25,000の高分子画分-1, 分子量25,000以上の高分子画分-2に分画し, それぞれの画分の花成誘導活性を調べた. その結果(Fig. 3-3), 低分子画分と高分子画分-1には花成誘導活性が認められたが, 中分子画分と高分子画分-2には活性は存在しなかった.

2 短日篩管液の花成誘導活性と濃度の相関

短日篩管液の高分子画分-1の培地への添加濃度と花成誘導活性の相関について調べた. 高分子画分-1を培地に添加した場合, どの濃度でも花芽を誘導し, 花成誘導活性は30 µg凍結乾燥重/mLで最高になり, それ以上高濃度では活性は低下する傾向にあった(Fig. 3-4).

3 短日篩管液の花成誘導活性に及ぼす暗期の影響

短日篩管液の高分子画分-1の花成誘導活性と実生に与えた暗期の関係を調べるために, 16時間明期/8時間暗期で6日育てた実生に様々な暗期を与えてから篩管液を採取し, 透析後, 高分子画分-1の花成誘導活性を調べた. Fig. 3-5に示したように, 暗期処理8時間から12時間までは花成誘導活性は認められなかった. 14時間以上の暗期処理で花成誘導活性が現われ, 15時間から24時間の暗期処理で最高となった.

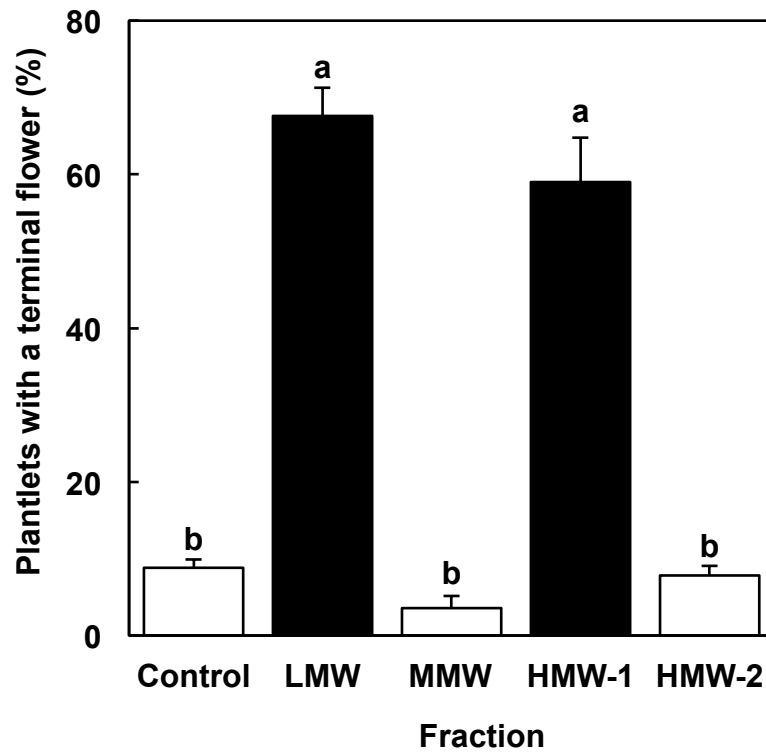


Fig. 3-3 Flower-inducing activities of fractions separated by dialysis.

The phloem exudate was prepared from cotyledons exposed to a single 16 h dark period. Using 30 μg freeze-dry weight mL^{-1} of low (<1,000, LMW), middle (1,000-10,000, MMW), and 2 high (10,000-25,000, HMW-1 and >25,000, HMW-2) molecular weight fractions, flower-inducing activity was examined. Control means without fraction. Means \pm SE, $n = 13$. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

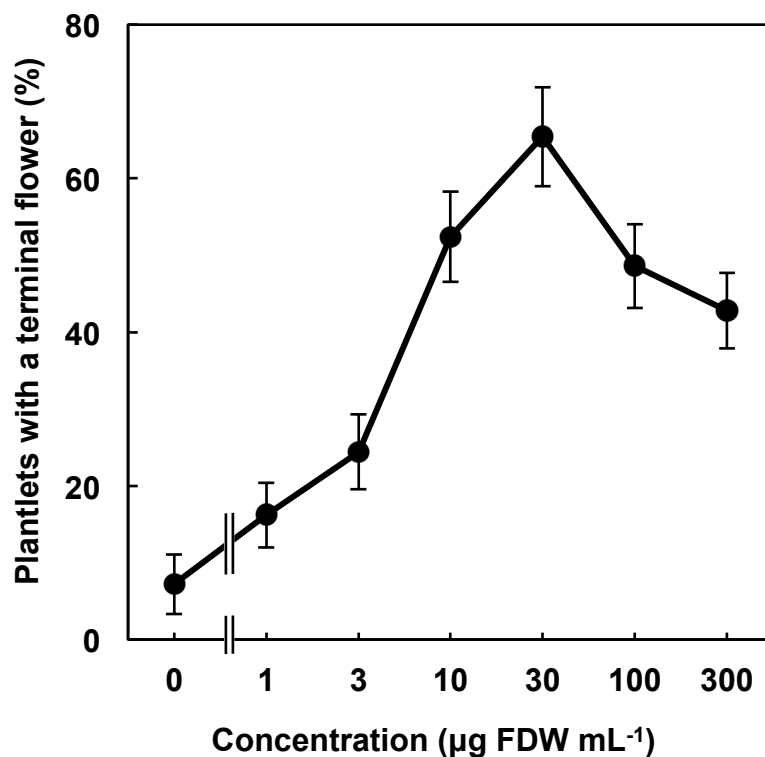


Fig. 3-4 Correlation between flower-inducing activity and concentration of high molecular weight-1 (molecular weight 10,000 to 25,000, HMW-1) fraction of phloem exudate (SD-PE).

The phloem exudate was prepared from short day-treated cotyledons (SD-PE). Various concentrations of HMW-1 fraction of SD-PE as indicated in figure were added assay medium, and flower-inducing activities were examined. FDW means freeze-dry weight. Means \pm SE, n = 13.

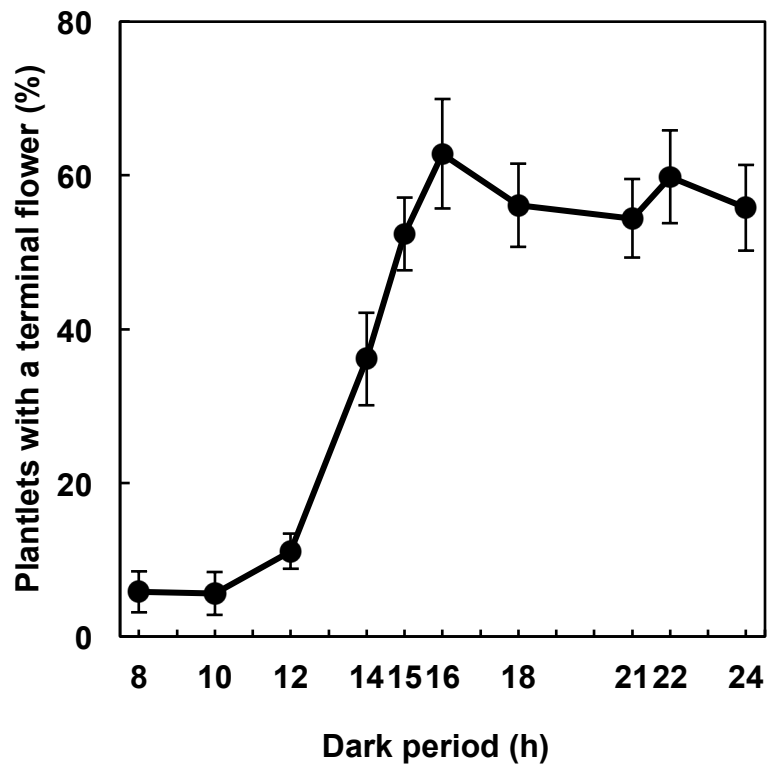


Fig.3-5 Effects of various dark periods on the flower-inducing activity of high molecular weight-1 (molecular weight 10,000 to 25,000, HMW-1) fraction of phloem exudate (PE).

PE was collected from the cotyledons of seedlings exposed to a single dark period as indicated in figure. The PE was fractionated by dialysis and separated low, middle, high-1 and high-2 molecular weight fractions. The 30 μg freeze-dry weight mL^{-1} of HMW-1 fraction was added to assay medium. Means \pm SE, n = 13.

4 短日篩管液の酵素処理

植物の高分子物質としてはタンパク質, DNAやRNAなどの核酸, 多糖類などが考えられる. 花成誘導活性を有する高分子画分-1の物質的特性を明らかにするため, 高分子画分-1を各種の高分子物質分解酵素で処理し, 花成誘導活性を調べた. 高分子画分-1をProteinase Kで処理した場合のみ花成誘導活性は消失したが, 他の酵素(DNase, RNase, hemicellulaseとpectinaseの混合液)では花成誘導活性に影響はなかった(Fig. 3-6). また, それぞれの酵素のみによる処理は特に花成を誘導することはなかった.

5 短日篩管液のゲル濾過による分画

短日篩管液の高分子画分-1をゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し, それぞれの画分の花成誘導活性を調べた. その結果, 画分16が最も活性が高く, 次いで画分17と18が高かった(Fig. 3-7). 画分16~18の分子量はおよそ23,000 Daltonと推定された(Fig. 3-8).

6 短日篩管液の高分子画分の花成誘導活性に対する低分子画分の影響

ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて花成誘導活性を示した画分16~18を用いて, 短日篩管液中の低分子花成誘導物質の同時添加による影響について検討した. 短日篩管液の低分子画分を溶媒分配, イオン交換クロマトグラフィー, Sep-Pak C18 cartridgeによって分画し, 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μg 凍結乾燥重/mLの濃度で短日篩管液の高分子画分-1のゲル濾過クロマトグラフィーによって分画された画分16~18と共に培地に添加した. その結果, 低分子画分の添加は高分子画分-1の花成誘導活性に影響しなかった(Fig. 3-9).

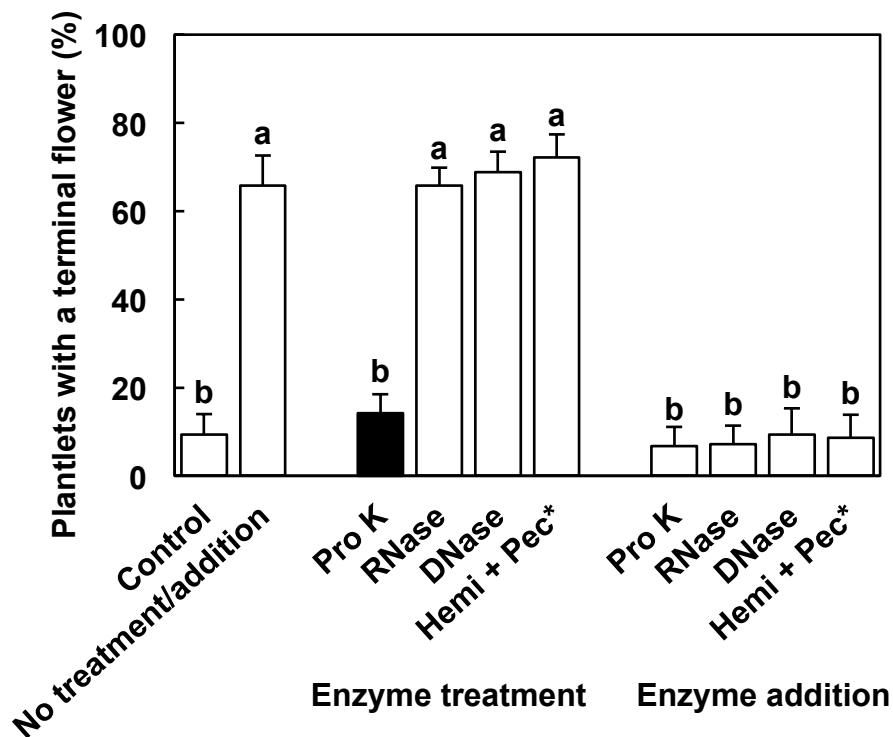


Fig. 3-6 Effects of enzyme treatment on flower-inducing activity.

The phloem exudate was prepared from short day-treated cotyledons (SD-PE). The high molecular weight-1 (molecular weight 10,000 to 25,000, HMW-1) fraction of SD-PE was treated with proteinase K (Pro K), RNase A, DNase I (each of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), or mixture of hemicellulase and pectinase SE-150 (each of 1 unit, Hemi + Pec*), and the flower-inducing activity of each treated sample was examined. Addition means each enzyme was added to the assay medium. Control means without any enzymes and/or treated sample. Addition of the HMW-1 fraction to the assay medium without treatment was indicated in figure as No treatment/addition. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

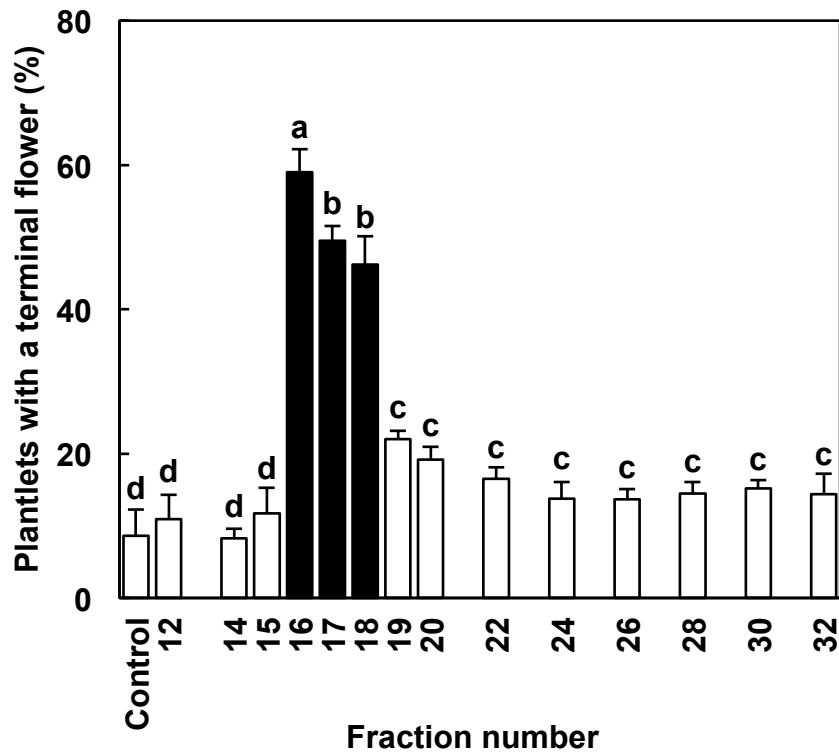


Fig. 3-7 Flower-inducing activities of fractions separated by gel filtration.

The phloem exudate was prepared from short day-treated cotyledons (SD-PE). The high molecular weight-1 (molecular weight 10,000 to 25,000) fraction of SD-PE was separated by gel filtration (Sephadex G-50). As the void volume was 20 mL (fraction 11), flower-inducing activities of fraction 12 to 32 were examined. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

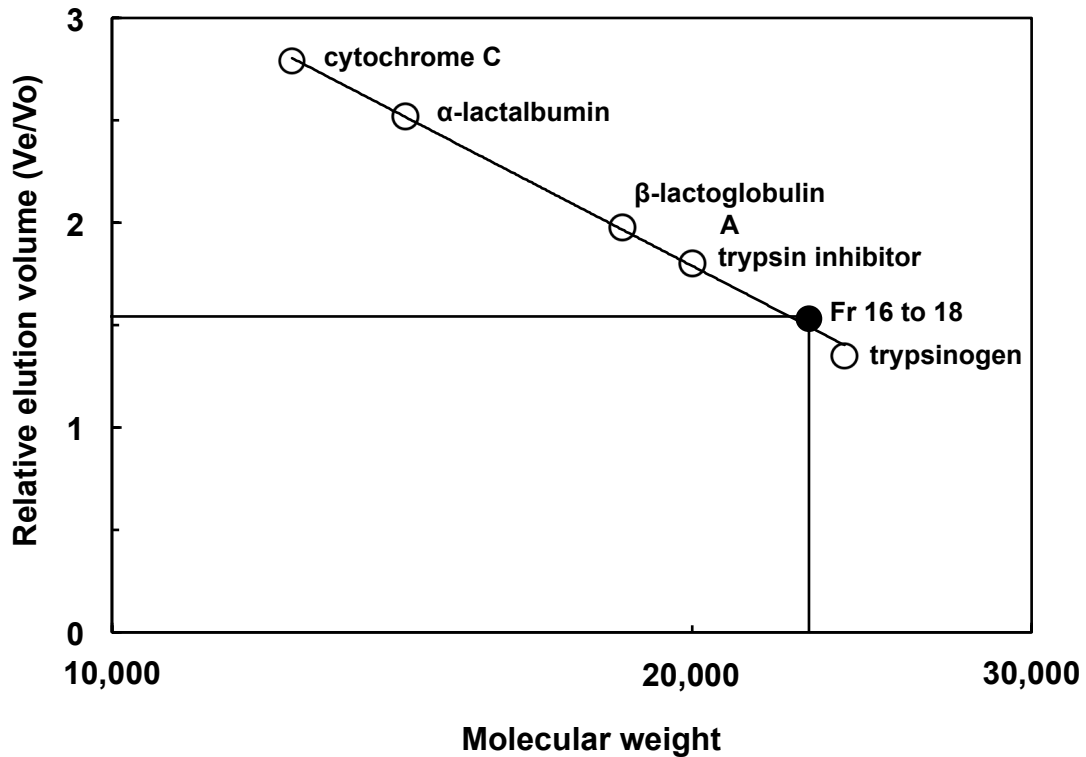


Fig. 3-8 Estimation of molecular weight of fraction 16 to 18 by gel filtration of Sephadex G-50.

The phloem exudate was prepared from short day-treated cotyledons (SD-PE). The high molecular weight-1 (molecular weight 10,000 to 25,000) fraction of SD-PE was separated by gel filtration on Sephadex G-50. As the void volume (V_o) was 20 mL (fraction 11) determined with Blue Dextran 2,000. The elution volume (V_e) of the active fraction (fraction 16 to 18) and maker proteins was calibrated by measuring the absorbance at 280 nm.

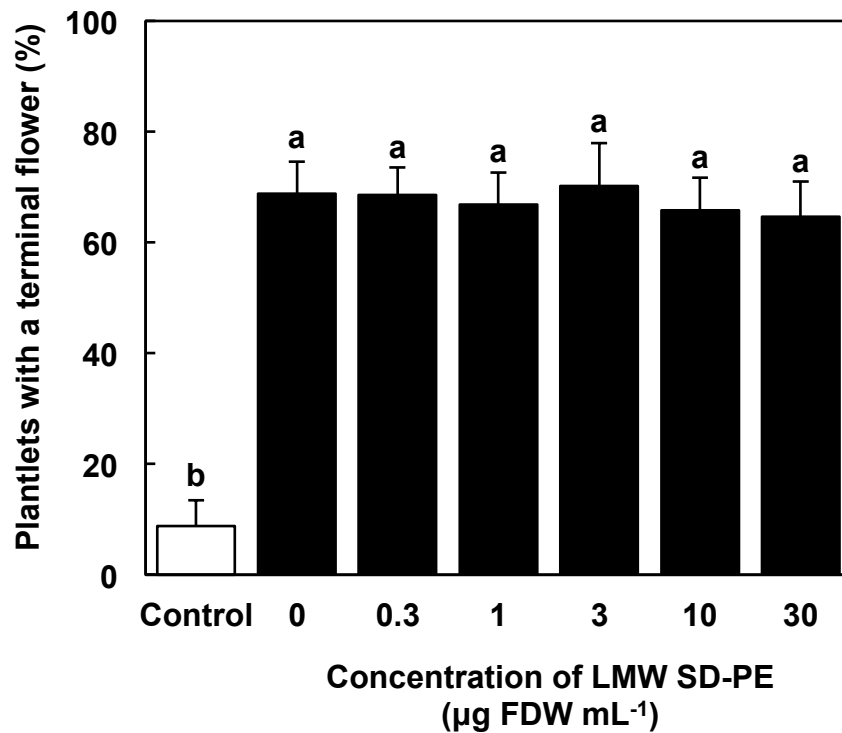


Fig. 3-9 Correlative effects of low and high molecular weight fraction of phloem exudate on flower-inducing activity.

The phloem exudate from short day-treated cotyledons (SD-PE) was dialyzed with 3 kinds of dialysis membrane successively, such as molecular weight cut off 1,000, 10,000 and 25,000. The resultant low (less than 1,000, LMW) and high-1 (10,000 to 25,000, HMW-1) fractions were used. The LMW fraction was partially purified with solvent participation, ion exchange chromatography and Sep-Pak C18. The active fractions of HMW-1 separated by gel filtration chromatography (fraction 16 to 18) was added to assay medium (30 µg FDW mL⁻¹) with or without active fraction of LMW at various concentrations as indicated in figure and flower-inducing activity was examined. Control means without any fraction. FDW means freeze-dry weight. Means ± SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

7 短日篩管液の高分子画分の花成誘導活性に対する長日篩管液の影響

ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて花成誘導活性を示した画分16~18を用いて、長日篩管液中の花成阻害物質の同時添加による影響について検討した。長日篩管液の低分子画分を溶媒分配、イオン交換クロマトグラフィー、Sep-Pak C18 cartridgeによって分画し、0, 1, 3, 10, 30 μg 凍結乾燥重/mLの濃度で、短日篩管液の高分子画分-1のゲル濾過クロマトグラフィーによって得られた画分16~18と共に培地に添加した。その結果、短日篩管液の高分子画分-1の花成誘導活性は長日篩管液の低分子画分の同時添加によって阻害された(Fig. 3-10)。

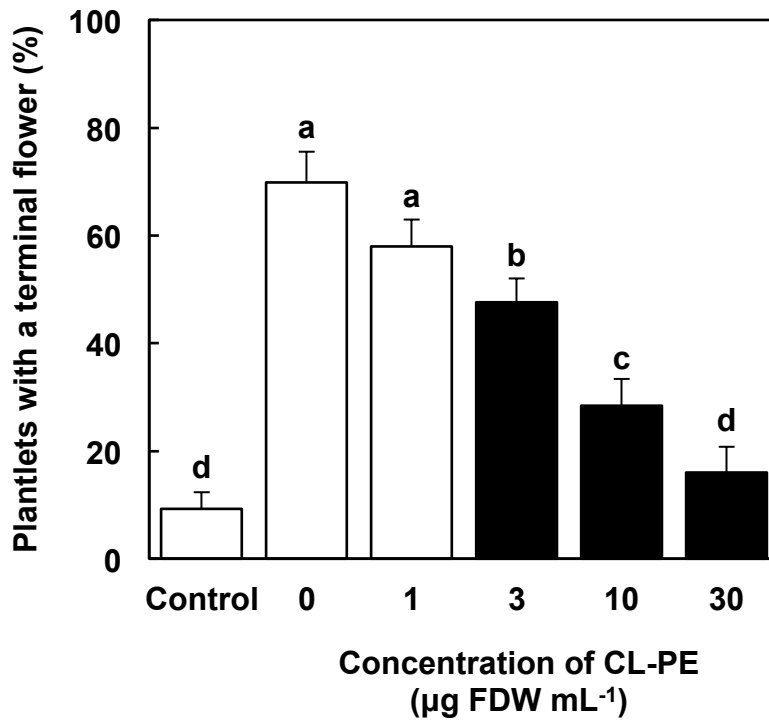


Fig. 3-10 Correlative effects of CL-PE and HMW-1 fraction of SD-PE on flower-inducing activity.

The phloem exudate from short day-treated cotyledons (SD-PE) was dialyzed with 3 kinds of dialysis membrane successively, such as molecular weight cut off 1,000, 10,000 and 25,000. The resultant high molecular weight-1 (10,000 to 25,000, HMW-1) fraction was used. The phloem exudate prepared from cotyledons of seedlings grown under continuous light condition (CL-PE) was partially purified with dialysis, solvent participation, ion exchange chromatography and Sep-Pak C18. The active fractions of HMW-1 separated by gel filtration chromatography (fraction 16 to 18) was added to assay medium (30 µg FDW mL⁻¹) with or without active fraction of CL-PE at various concentrations as indicated in figure and flower-inducing activity was examined. Control means without any fraction.

FDW means freeze-dry weight. Means \pm SE, n = 13. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$ level.

第5節 考察

高分子量の花成誘導物質の存在については、シロイヌナズナを用いて作出された多数の花成遅延突然変異のうち、*FT*遺伝子が単離され(Kobayashi et al., 1999), この遺伝子の産物であるFTタンパク質が花成を誘導すると報告された(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). 短日植物であるイネにおいても、FT相同タンパク質であるHd3aタンパク質が見いだされ、しかもそれは葉から茎頂へ移動することが報告された(Tamaki et al., 2007; Mathieu et al., 2007). 同様にFT相同タンパク質が中性植物のトマト(Lifschitz et al., 2006), 短日植物のニホンカボチャと中性植物のセイヨウカボチャ(Lin et al., 2007), 短日植物のニホンアサガオst. Violet (Hayama et al., 2007)などで報告されている。

セイヨウアサガオst. Heavenly Blueにおいて、1回16時間の誘導暗期を与えた実生の子葉から採取した篩管液(短日篩管液)は花成誘導活性があり、その篩管液を透析によって分画すると分子量1,000以下の低分子画分と分子量10,000以上の高分子画分で活性は検出された(第1章). 短日篩管液の低分子画分については第1章で述べた。本章では分子量10,000以上の高分子花成誘導物質について検討した。

短日篩管液を透析によって分画した結果、分子量1,000以下の低分子画分と分子量10,000-25,000の高分子画分-1に花成誘導活性が検出された(Fig. 3-3). 低分子画分については第1章で述べたように活性物質は極性の高い酸性の物質である。また、第1章では分子量10,000以上の画分にも花成誘導物質が含まれていることを示した。分子量10,000以上の画分をさらに排除分子量25,000の透析膜で透析し、分子量10,000-25,000の画分(高分子画分-1)と分子量25,000以上の画分(高分子画分-2)に分画したところ高分子画分-1に活性があった。そこで、高分子画分-1について検討した。Fig. 3-4に示したように、高分子画分-1を添加した場合、どの濃度でも花成を誘導することから高分子画分-1には花成誘導物質が含まれていると考えられた。高分子画分-1の花成誘導活性と実生に与えた暗期の関係を調べると、暗期処理8時間から12時間までは活性は認められず、15時間から24時間の暗期処理で高分子画分-1

の花成誘導活性は最高となった(Fig. 3-5). 第1章では12時間の暗期を与えた実生から切り取られた茎頂は弱い花成反応を示した. このことは低分子物質が12時間の暗期処理によって生成されるけれども, 高分子物質は12時間の暗期処理では生成されない可能性を示している. 高分子画分-1を各種分解酵素で処理した結果(Fig. 3-6), Proteinase Kで処理した場合のみ花成誘導活性は消失した. 従って, 高分子画分-1における花成誘導物質はタンパク質であると思われる. 高分子画分-1をゲル濾過によって分画した結果(Fig. 3-7), 画分16~18で高い花成誘導活性を示し, 推定される分子量を約23,000 Daltonと見積もった(Fig. 3-8). いくつかの植物種においてこれまでに報告されているFTタンパク質やFT相同タンパク質の分子量もまたおよそ23,000 Daltonである(Kobayashi et al., 1999; Hayama et al., 2007; Lin et al., 2007)ことから, 短日篩管液の高分子画分-1における花成誘導物質はFT相同タンパク質である可能性が高いと思われる. 短日篩管液の高分子画分-1のゲル濾過クロマトグラフィーにおいて花成誘導活性を示した画分16~18を用い, 花成誘導活性を有する短日篩管液の低分子画分と花成阻害活性を有する長日篩管液の同時添加による影響をそれぞれ検討した. その結果, 短日篩管液の低分子画分の添加では画分16~18の花成誘導効果に変化はなく, 高分子花成誘導物質の花成誘導活性に影響しなかった(Fig. 3-9). また, 長日篩管液の同時添加によって画分16~18の花成誘導効果は完全に失われた(Fig. 3-10). FTタンパク質は茎頂において, 花器官形成遺伝子の発現を誘導することで作用していると考えられている(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). 長日篩管液(花成阻害物質)がこの反応過程のどの部分に働いているのかという問題については, 今後遺伝子レベルでの検討が必要だろう.

セイヨウアサガオst. Heavenly Blueにおいて, 短日篩管液中の花成誘導物質は低分子の物質とFT相同タンパク質であるかもしれない高分子の物質であったが, その花成制御メカニズムを明確にすることはできなかった.

今後, 短日篩管液と長日篩管液の低分子画分の活性物質の化学的性質を明らかにし, 花成誘導物質と花成阻害物質の単離・同定を行い, さらに, 高分子花成誘導物質であるだろう FT 相同タンパク質をコードしている遺伝子を単離する必要がある. そ

して, セイヨウアサガオにおいて, 花成が高分子の FT 相同タンパク質と低分子の花成誘導物質及び花成阻害物質との相関によって, どのようにコントロールされているのかを明らかにするべきである.

引用文献

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science** 309: 1052-1056.
- Bonner, J., Bonner, D. (1948) None on induction of flowering in *Xanthium*. **Bot. Gaz.** 110: 154-156.
- Chailakhyan, M. Kh. (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. **C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS.** 16: 227-230.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountia, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science** 316: 1030-1033.
- Fujioka, S., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., Takimoto, A., Cleland, C. F. (1986) Isolation and identification of nicotinic acid as a flower-inducing factor in *Lemna*. **Plant Cell Physiol.** 27: 103-108.
- Hayama, R., Agashe, B., Luley, E., King, R., Coupland, G. (2007) A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. **Plant Cell**

19: 2988-3000.

Hodson, H. K., Hamner, K. C. (1970) Floral inducing extract from *Xanthium*. **Science** 167: 384-385.

Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1990) Flower-inducing activity of phloem exudate in cultured apices from *Pharbitis* seedlings. **Plant Cell Physiol.** 31: 705-709.

Ishioka, N., Tanimoto, S., Harada, H. (1991) Flower-inducing activity of phloem exudates from *Pharbitis* cotyledons exposed to various photoperiods. **Plant Cell Physiol.** 32: 921-924.

Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., Chory, J., Harrison, M. J., Weigel, D. (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. **Science** 286: 1962-1965.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science** 286: 1960-1962.

Kondoh, M., Murakami, A., Shigeta, C., Tanimoto, S. (1999) Flower-inducing and -inhibiting activities of phloem exudate from cotyledons of *Pharbitis* seedlings. **Plant Growth Regul.** 28: 107-116.

Koornneef, M., Hanhart, C. J., van der Veen, J. H. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*.

Mol. Gen. Genet. 229: 57-66.

Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvares, J. P., Esched, Y. (2006) The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103: 6398-6403.

Lin, M. K., Belanger, H., Lee, Y. J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K. I., Miura, E., Xoconstle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R. A., Phinney, B., Lough, T. J., Lucas, W. J. (2007) FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. **Plant Cell** 19: 1488-1506.

Lincoln, R. G., Cunningham, A., Hamner, K. C. (1964) Evidence for florigenic acid. **Nature** 202: 559-561.

Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., Schmid, M. (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. **Curr. Biol.** 17: 1055-1060.

Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., Shimamoto, K. (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. **Science** 316: 1033-1036.

Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. **Science** 309: 1056-1059.

Zeevaart, J. A. D. (1979) Perception, nature and complexity of transmitted signals. In: "**La physiologie de la floraison**" (ed. by Champagnat, P., Jacques, R.), CNRS, Paris, p 59-90.

総括

第1章では、短日処理をしたセイヨウアサガオ (*Ipomoea tricolor*) st. Heavenly Blue 実生の子葉から採取した短日篩管液の部分精製を行った。まず、セイヨウアサガオ st. Heavenly Blue の花成反応に及ぼす暗期の影響を調べた。その結果、16時間の暗期処理で最も高い花成反応が見られた。次に、1回16時間の暗期処理を行った実生の子葉から採取した短日篩管液を排除分子量1,000と排除分子量10,000の透析膜を用いて透析を行った結果、分子量1,000以下の低分子画分と分子量10,000以上の高分子画分に花成誘導活性が認められた。

第1章ではここで得られた低分子画分の分画を行った。低分子画分中の花成誘導物質は熱に安定であった。低分子画分をクロロホルムと酢酸エチルによって分配すると花成誘導活性は水相画分に検出され、この花成誘導物質は極性が高い物質であると考えられる。水相画分をイオン交換樹脂によって分画した結果、花成誘導活性は陽イオン交換樹脂に吸着する画分で検出され、低分子画分中の活性物質は酸性物質であると思われる。陽イオン交換樹脂による分画で活性があった画分をさらに Sep-Pak C18 cartridge で分画したとき、20%と25%メタノールで溶出した画分で最も高い花成誘導活性が見られた。以上の結果から、短日篩管液における低分子画分中の花成誘導物質は熱に安定で極性の高い酸性の物質であり、精製作業によって花成誘導活性は約3~10倍程度増加した。

第2章では、連続照明下で育てたセイヨウアサガオ st. Heavenly Blue 実生の子葉から採取した長日篩管液の部分精製を行った。長日篩管液を排除分子量1,000と排除分子量10,000の透析膜を用いて透析を行った結果、分子量1,000以下の低分子画分に花成阻害活性が見られ、花成阻害物質は分子量1,000以下の低分子物質であることがわかった。この花成阻害物質は熱に安定であり、クロロホルムと酢酸エチルによる分配の結果、極性が高い物質であると考えられる。水相画分をイオン交換樹脂によって分画すると、花成阻害活性は陰イオン交換樹脂に吸着する画分で検出され、この花成阻害物質は塩基性の物質であると思われる。陰イオン交換樹脂による分画で活性があった画分をさらに Sep-Pak C18 cartridge で分画したとき、15%メタノールで溶出した画分で花成阻害活性が見られた。以上の結果から、長日篩管液

の花成阻害物質は分子量 1,000 以下の低分子物質で熱に安定な極性が高い塩基性の物質であり, 精製作業により花成阻害活性は約 10 倍に増加した.

第3章では, 短日処理したセイヨウアサガオ st. Heavenly Blue 実生の子葉から採取した短日篩管液の分子量 10,000 以上の高分子画分について調べた. 短日篩管液を排除分子量 1,000, 10,000, 25,000 の透析膜を用いて 4 画分に分画した結果, 分子量 1,000 以下の低分子画分と分子量 10,000-25,000 の高分子画分-1に花成誘導活性が見られた. 第3章では高分子画分-1について調べた. 高分子画分-1を培地に添加したとき, どの濃度でも花成を誘導することから高分子画分-1には花成誘導物質が含まれていると考えられる. 高分子画分-1の花成誘導活性と実生に与えた暗期の関係を調べたとき, 暗期処理8時間から12時間までは活性は認められず, 15時間から24時間の暗期処理で高分子画分-1の花成誘導活性は最高となった. 高分子画分-1を Proteinase K で処理すると花成誘導活性は消失した. 従って, 高分子画分-1における花成誘導物質はタンパク質であると思われる. 高分子画分-1をゲル濾過によって分画した結果, 画分 16~18 で高い花成誘導活性を示し, 推定される分子量は約 23,000 Dalton と見積もられた. いくつかの植物種においてこれまでに報告されている FT タンパク質や FT 相同タンパク質の分子量から, 短日篩管液の高分子画分-1における花成誘導物質は FT 相同タンパク質である可能性が高いと思われる. 高分子画分-1のゲル濾過クロマトグラフィーにおいて花成誘導活性を示した画分 16~18 と短日篩管液の低分子画分の同時添加は花成誘導効果に影響を与えなかった. また, 高分子画分-1のゲル濾過クロマトグラフィーにおいて花成誘導活性を示した画分 16~18 への長日篩管液の同時添加は画分 16~18 の花成誘導効果を完全に失わせた.

本研究では, セイヨウアサガオ st. Heavenly Blue から採取した篩管液中の低分子と高分子の花成誘導物質そして花成阻害物質の特性をいくつか明らかにした. 高分子花成誘導物質は FT 相同タンパク質である可能性が高かった. FT タンパク質は複合体を形成し, 花芽形成遺伝子の転写を活性化させ, 花成を開始させると考えられている. セイヨウアサガオ st. Heavenly Blue において, 高分子花成誘導物質 (FT 相同タンパク

質)が形成する活性化複合体に短日篩管液中の低分子花成誘導物質が関与している可能性も考えられる。また、高分子花成誘導物質と花成阻害活性をもつ長日篩管液の同時添加による高分子花成誘導物質の誘導効果の喪失も見られた。長日篩管液が高分子花成誘導物質の誘導効果に対してどのような作用を及ぼしているのか確かめるために、高分子花成誘導物質の分子機構を明らかにすることが必要であろう。

セイヨウアサガオst. Heavenly Blueにおいて、花成が複数の花成誘導物質の相互作用や花成阻害物質との相互作用によって制御されているのかを確かめるために、今後、短日篩管液と長日篩管液の低分子画分の活性物質の化学的性質を明らかにし、花成誘導物質と花成阻害物質の単離・同定を行い、さらに、高分子花成誘導物質(FT相同タンパク質)の遺伝子(DNA)を含めた活性化複合体の立体構造を決定し、分子機構を解明する必要があるだろう。

謝辞

学位論文作成に際し、ご懇篤なご指導とご鞭撻を賜りました佐賀大学農学部応用生物科学科・一色司郎教授に心からお礼申し上げます。

また、数々の有益なご示唆を戴きました佐賀大学農学部応用生物科学科・石丸幹二教授、佐賀大学農学部応用生物科学科・辻田有紀准教授、鹿児島大学農学部鑑賞園芸学研究室・橋本文雄教授、琉球大学農学部亜熱帯地域農学科・嬉野健次准教授に篤くお礼申し上げます。

最後に直接のご指導、ご助言を戴くとともに、論文作成にあたりご助力下さいました佐賀大学・谷本静史名誉教授に深く感謝いたします。